
Sequenzselektive Schadensbildung und Reparatur von DNA durch UV-Bestrahlung

Corinna Lucia Kufner



München 2018

Sequenzselektive Schadensbildung und Reparatur von DNA durch UV-Bestrahlung

Corinna Lucia Kufner

Dissertation

an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Corinna Lucia Kufner
aus Erlangen.

München, den 2. Mai 2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Gilch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2018

Kurzfassung

In der frühen Entwicklung des Lebens, ohne den Schutz der heutigen Erdatmosphäre, war die DNA erheblich stärkerer UVC-Strahlung ausgesetzt als heute. Diese kann DNA-Schäden hervorrufen, was zu einem Verlust der genetischen Information führen kann. Vor der Evolution enzymatischer Reparatur war die DNA zum Überleben folglich auf intrinsische Stabilisationsmechanismen angewiesen. In dieser Arbeit wurden erstmals die Quantenausbeuten sequenzselektiver Prozesse durch benachbarte Basen bei UV-Bestrahlung kurzer einzelsträngiger Oligonukleotide experimentell bestimmt.

Selbstreparatur: Die Fähigkeit von Sequenzen zur Selbstreparatur wurde am häufigsten UV-Schaden von DNA, dem Cyclobutan-Thymin-Dimer, systematisch mit UV/Vis Spektroskopie untersucht. Bei allen untersuchten Sequenzen mit an den Schaden angrenzenden Purin-Basen zeigte sich ein Reparaturverhalten, welches die direkte Photoreparatur des Schadens, deutlich übersteigt. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurde mit Hilfe von zeitaufgelöster Infrarot Anrege-Abtast-Spektroskopie untersucht.

8-OxoGuanin Schadensbildung: Die Einflüsse benachbarter Basen auf die Photoschädigung wurden am Beispiel des häufigsten oxidativen Schadens, 8-OxoGuanin, untersucht. Der Schädigungsmechanismus über ein langlebiges G-Radikal-Kation wurde experimentell widerlegt. Die sterische Anordnung der Basen, die Basenstapelung und die Länge der Oligonukleotide stellen wichtige Kriterien für die Schadensbildung dar. Die Reaktion eines Guanin-Neutralradikals mit dem umgebenden Wasser wird als Entstehungsmechanismus diskutiert.

Schadensbildung an statistischen Sequenzen: Der Selektionsprozess in der frühen Entwicklung des Lebens wurde durch UV-Belichtung kurzer einzelsträngiger Oligonukleotide vorgegebener Länge mit zufälliger Basenabfolge plausibel nachgestellt. Die Häufigkeitsverteilung überlebender Sequenzen wurde mit der neuen, massiv parallelen Next-Generation-Sequencing Methode über eine zuverlässige Statistik bestimmt. Die Ergebnisse spiegeln nicht nur die Häufigkeitsverteilung bisher bekannter Photoschäden wieder, sondern zeigen darüber hinaus die evolutionär wichtigen Einflüsse benachbarter Basen auf.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Basen-Nachbarschaft in kurzen Oligonukleotiden merklichen Einfluss auf die Photostabilität der Sequenz gegenüber UV-Strahlung hat, was von zentraler Bedeutung für die Selektionsprozesse in der frühen Entwicklung des Lebens ist.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Kurzfassung | v |
| 1. Einführung: Präbiotische Selektion | 1 |
| 2. Grundlagen | 5 |
| 2.1. DNA-Struktur | 5 |
| 2.2. Dynamik angeregter Zustände | 6 |
| 2.3. Typische Photoschäden | 8 |
| 3. Selbstreparatur | 13 |
| 3.1. Ausgangspunkt und Fragestellung | 13 |
| 3.2. Methode und Vorgehensweise | 14 |
| 3.2.1. Auswahl der Proben | 14 |
| 3.2.2. Analytische Verfahren | 16 |
| 3.2.3. Probenherstellung | 18 |
| 3.2.4. Probenpräparation | 20 |
| 3.2.5. Belichtungsexperimente | 20 |
| 3.2.6. Theoretische Hintergründe | 24 |
| 3.2.7. Schmelzkurven | 27 |
| 3.2.8. TRIR Spektroskopie | 28 |
| 3.3. Ergebnisse | 32 |
| 3.3.1. Auswertung der stationären Differenzspektren | 32 |
| 3.3.2. Experimentelle Bestimmung der Quantenausbeuten | 40 |
| 3.3.3. Ergebnisse der Doppelstrang-Experimente | 46 |
| 3.3.4. HPLC-Analyse reparierter Einzelstränge | 53 |
| 3.4. Mechanismus des Ladungstransfers | 55 |
| 3.4.1. Auswahl des TRIR Spektralausschnitts | 57 |
| 3.4.2. Ergebnisse der TRIR Messungen | 61 |
| 3.5. Zusammenfassung Selbstreparatur | 71 |
| 4. 8-OxoGuanin Schadensbildung | 75 |
| 4.1. Grundlagen | 75 |
| 4.2. Methode und Vorgehensweise | 77 |
| 4.3. Ergebnisse | 80 |
| 4.3.1. Referenzierung der Daten | 83 |
| 4.3.2. Quantenausbeuten | 86 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.3. Einflüsse der benachbarten Basen | 86 |
| 4.4. Mechanismus der 8-OxoG Schadensbildung | 89 |
| 4.4.1. Ergebnisse der TRIR Messungen | 89 |
| 4.4.2. Bildung von 8-OxoG über das G-Neutralradikal | 95 |
| 5. Schadensbildung an statistischen Sequenzen | 101 |
| 5.1. Sequencing by Synthesis | 101 |
| 5.2. Konzeption der Experimente | 102 |
| 5.3. Datenauswertung | 106 |
| 5.4. Ergebnisse | 109 |
| 5.4.1. Dimere | 109 |
| 5.4.2. Trimere und Tetramere | 110 |
| 5.4.3. Zebrafisch | 112 |
| 6. Zusammenfassung | 115 |
| A. Anhang | 117 |
| Abbildungsverzeichnis | 119 |
| Tabellenverzeichnis | 121 |
| Literatur | 123 |
| Internetbasierte Referenzen | 135 |
| Danksagung | 137 |

1. Einführung: Präbiotische Selektion

Organismen speichern ihre überlebenswichtigen Informationen in ihrem Genom. Jeder Prozess, durch den die Desoxyribonukleinsäuren (deoxyribonucleic acid, DNA) modifiziert oder geschädigt wird, gefährdet potentiell das Überleben des Organismus [Kan10]. Eine wesentliche Gefährdung geht von der UV-Strahlung der Sonne aus, welcher die Organismen ausgesetzt sind. In höheren Organismen haben sich daher komplexe enzymatische Reparaturmechanismen entwickelt, wie z. B. die Nucleotide Excision Repair [Lin93].

Die Möglichkeiten für UV-Strahlung das Erbgut zu schädigen sind vielfältig. Beispielsweise können Schäden an einzelnen Basen auftreten. Ein Repräsentant dieser Gruppe sind oxidative Schäden, welche durch UV-Strahlung hervorgerufen wurden. Aufgrund ihrer molekularen Beschaffenheit sind die vier kanonischen DNA-Basen, Guanin (G) - Adenin (A) - Thymin (T) und Cytosin (C) (Abbildung 1.1), unterschiedlich anfällig für Photoschäden.

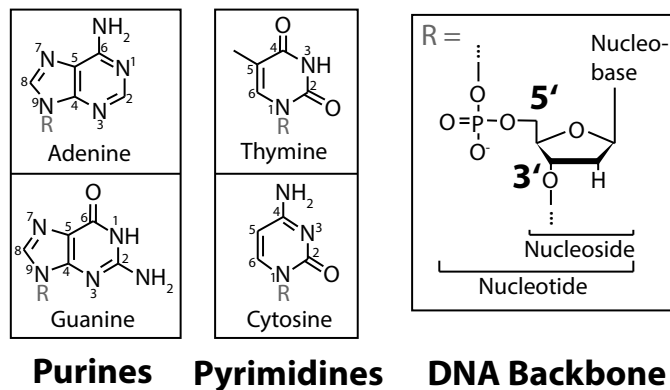


Abbildung 1.1.: Molekülstrukturen der vier kanonischen DNA-Basen und des DNA-Rückgrates (adaptiert von Buc15).

So treten oxidative Schäden zum Beispiel am häufigsten bei G in Form von 8-OxoG auf, wobei das Molekül am C8-Atom oxidiert wird [Lu15]. Etwas seltener kommt es zur Bildung von 8-OxoA [Ber10]. Bis zu einem Faktor von 1000 öfter als oxidative Schäden, entstehen Photodimere [Gom16, LR93], bei denen benachbarte Basen kovalente Bindungen eingehen. Besonders anfällig für die Bildung solcher Schäden sind die beiden Pyrimidin-Basen C und T. Der häufigste bekannte Photoschaden ist das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) zwischen zwei benachbarten Thyminen [LR93]. Dabei öffnen sich aufgrund von UV-Strahlung die C5=C6 Doppelbindungen beider

Moleküle und schließen mit dem jeweiligen Nachbarmolekül einen Cyclobutan-Ring [Sch10]. Die Quantenausbeute, welche ein Maß für die Effizienz dieser Schadensbildung angibt, liegt im Bereich von wenigen Prozent [LR93].

Voraussetzung für die Bildung der genannten Photodimere ist die Präsenz einer entsprechenden Nachbarbase. Dies führt weiter zur Fragestellung: Können andere Nachbarbasen Photoschäden auch beeinflussen? Diese allgemeine Frage spricht zwei zentrale Teilbereiche an: Erstens spielen die Nachbarbasen bei der Entstehung eines Photoschadens eine Rolle? Und zweitens können Nachbarbasen einen vorhandenen Photoschaden beeinflussen, im Extremfall sogar reparieren?

Mit diesen Fragen wird ein wesentlicher Kernpunkt der evolutionären Entwicklung aufgegriffen. Wenn es Mechanismen gibt, durch die benachbarte Basen sich unter UV-Einstrahlung gegenseitig stabilisieren oder destabilisieren können, beeinflusst dies die Überlebenschancen einzelner Sequenzen. Solche Mechanismen hätten eine unmittelbare Auswirkung auf die Selektion in frühen Stadien der DNA-Entwicklung gehabt. Ein Schlüsselement der Entwicklungsgeschichte sind die vorherrschenden Umwelteinflüsse. Dies unterscheidet die frühe Evolution des Lebens erheblich von der heutigen Entwicklung. Ein wesentlicher Unterschied liegt in der heutigen Erdatmosphäre, welche sich im Lauf der Erdgeschichte erst ausgebildet hat [Osc03]. Diese ist verantwortlich für das Spektrum der UV-Strahlung, welches die Erdoberfläche erreicht. Verglichen mit heutigen Bedingungen, hat ein erheblich höherer Anteil UVC-Strahlung die frühe Erdoberfläche erreicht [RWS17]. Dies ist insofern für die DNA gefährlich, als dass alle vier kanonischen Basen nahe 260 nm ein Absorptionsmaximum haben (Abbildung 1.2).

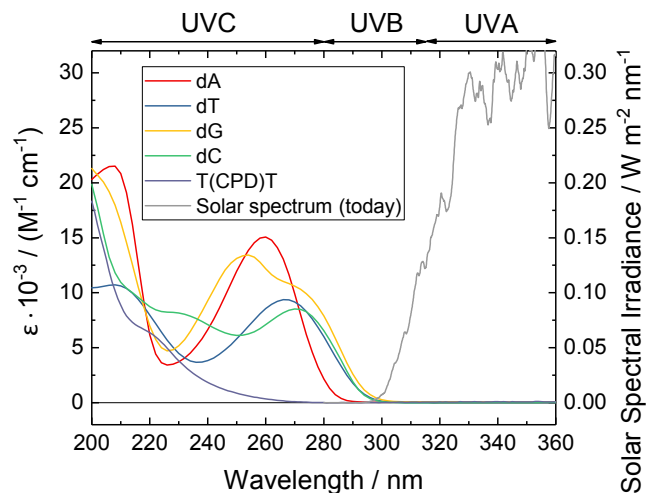


Abbildung 1.2.: Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der kanonischen DNA-Basen und des T(CPD)T-Dimers im Vergleich zum heutigen Sonnenspektrum (nach SGZ15, 18f, Pan12).

Hatten sich UV-induzierte DNA Schäden erst einmal gebildet, standen, im Gegensatz zu heute, keine komplexen enzymatischen Reparaturmechanismen zum Schutz des Genoms zur Verfügung. Die präbiotische DNA war auf einfachere Alternativen angewiesen. Eine solche könnten intrinsische sequenzselektive Reparaturmechanismen sein, welche den Anstoß zu dieser Arbeit gegeben haben [Buc16]. Diese wurden anhand von präbiotisch plausiblen kurzen Modellsequenzen am Beispiel des T(CPD)T Schadens eingehend untersucht. Dieser Teil bildet den Kernpunkt der Arbeit. Darüber hinaus wurde die Bildung des 8-OxoG Schadens in Abhängigkeit der benachbarten Basen untersucht, sowie die sequenzselektive Photostabilität zufälliger Basenabfolgen in Form einer breiten statistischen Analyse. UV-induzierte sequenzselektive Mechanismen, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden, könnten die Grundlagen des heutigen Lebens geprägt haben.

2. Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden grundlegende Begriffe zur DNA-Photophysik eingeführt. Dabei werden zunächst strukturelle Aspekte der DNA vorgestellt. Weiterhin wird auf die Photoanregung der DNA-Basen durch UV-Licht eingegangen und daraus resultierende Photoschäden vorgestellt.

2.1. DNA-Struktur

Ein wesentliches Merkmal der in [Abbildung 1.1](#) vorgestellten Nukleotide ist die Eigenschaft über das Phosphat-Rückgrat kovalente Bindungen zum 5' bzw. 3' Ende eines benachbarten Nukleosids einzugehen [[BTS06](#)]. Somit entstehen Oligonukleotide, welche durch die Abfolge ihrer Nukleobasen genetische Information tragen. Es besteht die Konvention, die Sequenzen durch Benennung der DNA-Basen vom 5' zum 3' Ende des Oligonukleotids zu notieren. Zum Beispiel ist liegt bei der Sequenz GAT das Guanin am 5' und das Thymin am 3' Ende des Oligonukleotids. Nach dieser Konvention erfolgt auch die Benennung im Rahmen dieser Arbeit.

Zu den wichtigsten Eigenschaften von Oligonukleotiden zählt die Fähigkeit zur Ausbildung von Doppelsträngen mit einem komplementären Oligonukleotid. Hierzu bilden sich Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den kanonischen DNA-Basen Guanin und Cytosin, sowie Adenin und Thymin aus (**Watson-Crick-Bindungen**, [Abbildung 2.1](#), [WC53](#)). Die gebildeten Doppelstränge verfügen über charakteristische helikale Strukturen. Chromosomen höherer Lebewesen liegen unter physiologischen Bedingungen typischerweise in der sogenannten B-Form vor [[BTS06](#)]. Dabei nehmen die Stränge die Form einer rechtsgängigen Helix mit einem Durchmesser von etwa 2.4 nm ein [[BTS06](#)]. Unabhängig der Komplementärstränge bilden einzelsträngige Oligonukleotide ebenfalls Helix-Strukturen aus [[Isa04](#)].

Neben den Watson-Crick-Bindungen können Wasserstoffbrücken auch an anderen Positionen gebildet werden (**Hoogsten-Bindungen**, [Mid09](#)). Diese Eigenschaft ist beispielsweise für die Entstehung von Quadruplex-Strukturen verantwortlich [[Gaj17](#)]. [Abbildung 2.1](#) zeigt eine G-Quadruplex-Struktur, einer Guanin-reichen Sequenz, welche durch Hoogsten-Bindungen von jedem Guanin zu zwei weiteren Guaninen stabilisiert wird. Die besondere räumliche Struktur wird im Genom höherer Lebewesen, wie zum Beispiel die Sequenz $(TTAGGG)_4$, biologisch dazu eingesetzt, die Enden des Chromosoms zu kennzeichnen (**Telomere**).

Im Rahmen der nukleosidischen Bindung der Basen an den Ribose-Rest sind die Basen frei drehbar. Durch die räumliche Ausrichtung der Basen besteht die

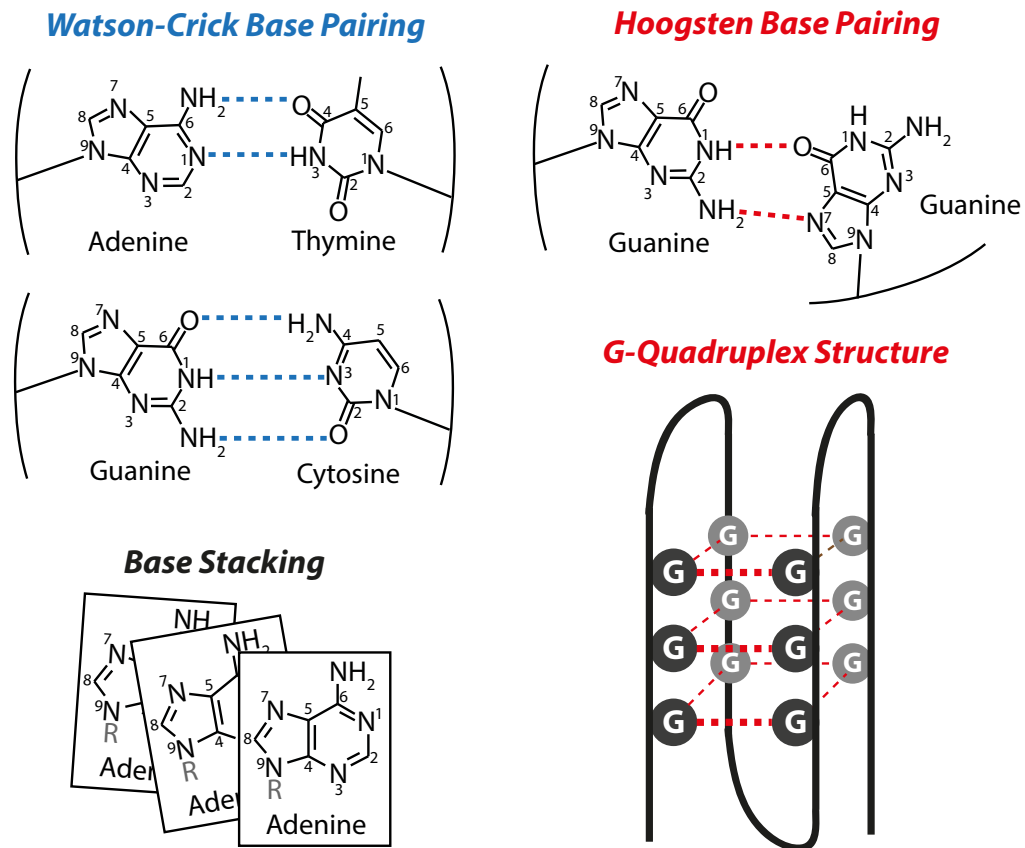


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Basenpaarungen und -stapelung, sowie einer G-Quadruplex-Struktur (nach [BBU15b](#), [Mid09](#), [BTS06](#), [CK14](#)).

Möglichkeit eines Überlapps der π -Elektronen-Systeme und somit einer Kopplung der Aromaten. Dieser Effekt wird als **Basenstapelung** (vgl. [Abbildung 2.1](#)) bezeichnet und kann das photophysikalische Verhalten der Oligonukleotide zum Teil erheblich beeinflussen. Die Basenstapelung wird daher im Rahmen dieser Arbeit intensiv diskutiert.

2.2. Dynamik angeregter Zustände

Einige Grundbegriffe der Photophysik sollen im Zusammenhang mit dieser Arbeit im Folgenden kurz vorgestellt werden. Für eine detaillierte Schilderung sei z. B. auf [[Buc15](#), [Mid09](#), [BBU15b](#), [Sch08](#)] verwiesen.

Zerfallskanäle Die kanonischen DNA-Basen sind gegenüber UV-Strahlung wesentlich photostabiler als ähnliche heterozyklische Verbindungen [[SGZ15](#)]. Diese Tatsache kann ihrerseits als Ergebnis präbiotischer Selektion aufgefasst werden [[SM09](#)]. Hinter-

grund für die hohe Photostabilität ist die ultraschnelle **interne Konversion (Internal Conversion, IC)** UV-angeregter DNA ($^1\pi\pi^*$), gefolgt von der Abgabe überschüssiger Schwingungsenergie an das Lösungsmittel [BBU15b]. Letztere wird als **Schwingungskühlung (Vibrational Cooling, VC)** bezeichnet [BBU15b]. Hierbei handelt es sich um den Haupt-Zerfallskanal UV-angeregter DNA [SGZ15]. Die Fluoreszenzemission ist relativ gering [Buc15]. [Abbildung 2.2](#) verdeutlicht diesen Vorgang schematisch.

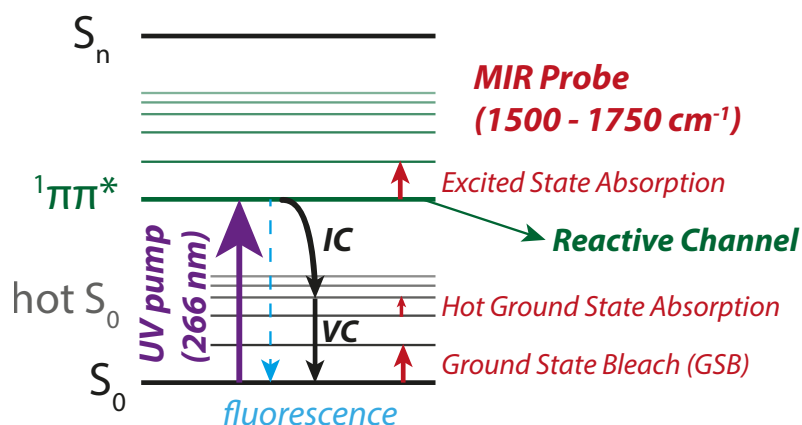


Abbildung 2.2.: Energieschema UV-angeregter DNA (nach BBU15b, Mid09).

Die durchlaufenen Energieniveaus können mit unterschiedlichen zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden untersucht werden [BBU15b]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ultraschnelle Prozesse an DNA-Oligonukleotiden mit Hilfe von zeitaufgelöster Anrege-Abtast-Spektroskopie untersucht ([Unterabschnitt 3.2.8](#)). Die Anregung erfolgte im UVC-Bereich, die Abtastung im Mittelinfraroten durch Detektion von charakteristischen Absorptionsänderungen. Dadurch zu beobachtende Übergänge sind in [Abbildung 2.2](#) als rote Pfeile markiert.

Die ultraschnelle IC kann durch **konische Überschneidungen (Conical Intersections, CI)** zweier Potentialflächen in einem multidimensionalen Kernkoordinatenraum erklärt werden [BBU15a]. Diese können beispielsweise durch Verbiegungen aus der Molekülebene oder durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel verursacht werden [BBU15a]. Strukturelle Gesichtspunkte nehmen daher entscheidenden Einfluss auf die Photophysik der DNA und könnten in der Entwicklung der kanonischen DNA-Moleküle eine Rolle gespielt haben [Buc15].

Neben dem direkten Zerfall des $^1\pi\pi^*$ bei DNA-Monomeren innerhalb weniger Pikosekunden [SGZ15] bestehen bei Pyrimidinen weitere Zerfallskanäle über einen $^1n\pi^*$ Zustand [Mid09]. Dieser relaxiert mit einer Lebensdauer von bis zu 150 ps in den elektronischen Grundzustand oder erzeugt einen $^3\pi\pi^*$ Triplett-Zustand mit einer Lebensdauer bis in den Mikrosekunden-Bereich [Mid09]. Durch ihre sehr hohe Lebensdauer eignen sich angeregte Triplett-Zustände als Auslöser biologisch relevanter Reaktionen [Liu16a].

Bei DNA-Oligomeren, wie den in dieser Arbeit untersuchten Proben, prägt die Basenstapelung das photophysikalische Verhalten [CK04]. In nicht gestapelter Anordnung gleichen die stattfindenden Prozesse dem zuvor beschriebenen Verhalten isolierter Monomere. In gestapelter Anordnung jedoch ist die Photorelaxation der DNA-Basen geprägt von den Wechselwirkungen zu den benachbarten Molekülen [Mid09]. Hierfür werden in der Literatur unterschiedliche Modelle diskutiert [MF84, Mid09, SMK12, CCK05, CCK06, Mar06, Gou90, KMP06]. Eine Möglichkeit ist die UV-induzierte Erzeugung eines delokalisierten Frenkel-Excitons, welches als Linear-kombination angeregter Monomere aufgefasst werden kann [Bou03]. Dieses zerfällt in weniger als 1 ps zu einem **Excimer-** (zwei identische) bzw. **Exciplex-Zustand** (zwei unterschiedliche) benachbarter Basen mit partieller Ladungstrennung [Mid09]. Aus diesen können ladungsgetrennte Radikalpaare mit Lebensdauern von bis zu mehreren hundert Pikosekunden hervor gehen (Unterabschnitt 3.4.2, Unterabschnitt 4.4.1). Ähnlich den Triplett-Zuständen sind diese mögliche Auslöser weiterer Reaktionen und werden deshalb in dieser Arbeit eingehend besprochen.

Ladungstransport Der photoinduzierte Ladungstransport benachbarter Basen hängt von den Redoxpotentialen der beteiligten Basen ab (Tabelle 3.1). Die Richtung in die ein Elektron oder Loch transferiert wird, hängt davon ab, ob die Energien von **HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital)** und **LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)** des Donator höher oder niedriger als die des Akzeptors sind [Buc15]. Liegt der Donator energetisch höher, wird ein LUMO-Elektron an den Akzeptor abgegeben. Andernfalls wird im HOMO ein Loch vom Donator an den Akzeptor transferiert [Wag05].

Für den Ladungstransfer über längere Sequenzen werden in der Literatur verschiedene Modelle diskutiert [Buc15]. Im Fall kurzer Sequenzen, wie der untersuchten Oligonukleotide, wird ein Mechanismus beschrieben, bei dem die Ladungen von Basen in zufälliger Richtung zu den jeweils benachbarten Basen springen [Jor98].

2.3. Typische Photoschäden

Molekülstrukturen Trotz der hohen Photoresistenz von DNA gegen UV-Strahlung, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Photoschäden, von denen eine Auswahl im Folgenden vorgestellt werden soll. Typische UV-Photoschäden sind in Abbildung 2.3 aufgeführt. Zur leichteren Wiedererkennung der beteiligten Atome wurde die Nummerierung der kanonischen Basen (vgl. Abbildung 1.1) beibehalten. Auf eine explizite Darstellung des Phosphat-Rückgrates wurde zur besseren Übersichtlichkeit verzichtet.

Eine Einteilung der Schäden nach der Anzahl der darin beteiligten Basen erlaubt eine einfache Klassifizierung. Hierbei wird der Fokus auf Mono- und Dimer-Schäden gelegt, welche in Oligonukleotiden am häufigsten auftreten. Bei isolierten DNA-Basen kann es mit geringer Häufigkeit zur Bildung von Trimer-Schäden, wie im Fall von

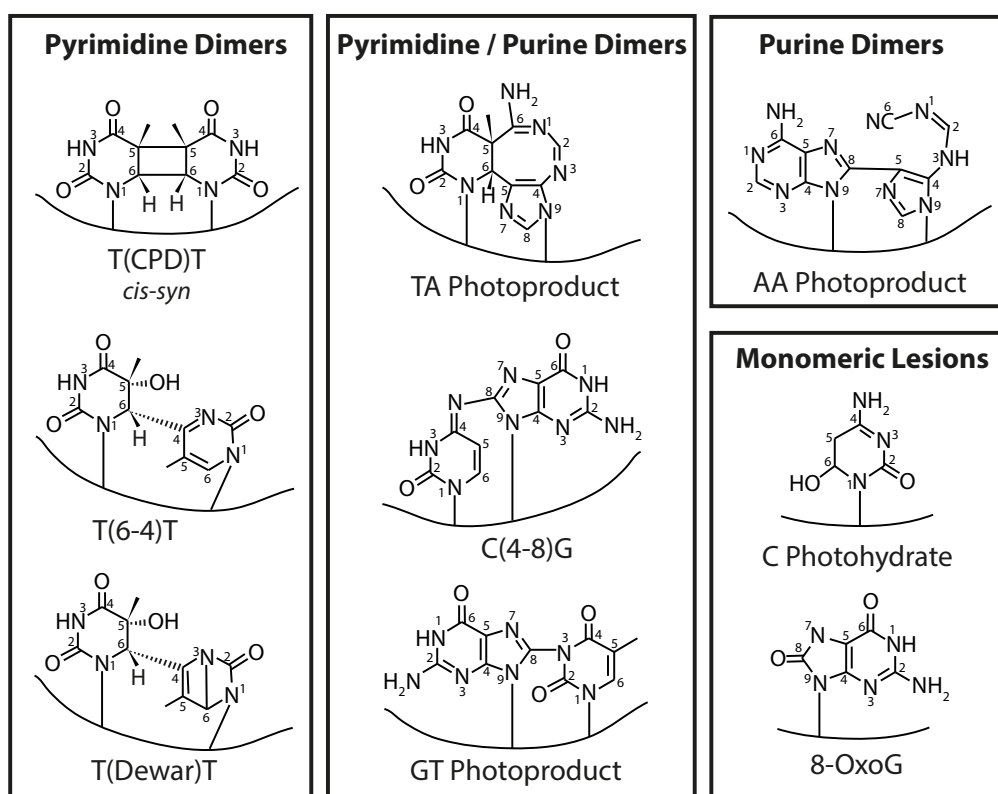


Abbildung 2.3.: Molekülstrukturen typischer UV-induzierter Photoschäden [Buc15, BBU15b, Mor90, Zha96, Mad13, CDR15].

Thymin, kommen [Mor90]. Diese sind jedoch in Oligonukleotiden aus sterischen Gründen unwahrscheinlich und werden daher im Folgenden nicht näher betrachtet. Unter dem Begriff „Dimer-Photoschäden“ werden Schäden zusammengefasst, bei denen zwei benachbarte DNA-Basen aufgrund von UV-Strahlung eine kovalente Bindung eingehen. Hier werden Pyrimidin-Dimere von Purin-Dimeren unterschieden. Pyrimidin-Purin- und Purin-Pyrimidin-Dimere sind in einer weiteren Gruppe zusammengefasst. Mit der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den beteiligten Basen geht eine räumliche Deformierung der ursprünglichen Strangstruktur einher [Ban09]. Diese dient gleichzeitig als charakteristisches Erkennungsmerkmal für Enzyme, wie zum Beispiel Polymerasen (vgl. Kapitel 5).

Die wichtigste Gruppe ist aufgrund ihrer hohen Häufigkeit die Gruppe der Pyrimidin-Dimere [BBU15b]. Dabei öffnen sich die Doppelbindungen zwischen den C5 und C6 Atomen und bilden kovalente Bindungen zum Nachbarmolekül. In Abbildung 2.3 sind hiervon jeweils nur die Thymin-Dimere stellvertretend aufgeführt. Im Genom treten Schäden an allen vier Pyrimidin-Dimer Kombinationen, TT, TC, CT und CC, auf. CPD Schäden sind photoreversibel [HIR07]. Diese Eigenschaft zählt zu den Kernpunkten dieser Arbeit (Kapitel 3). Es existieren vier Diastereomere des CPD

Schadens. Detaillierte Ausführungen finden sich beispielsweise in [Mor90]. Aufgrund sterischer Einschränkungen treten im Doppelstrang nur Syn-Isomere auf [Buc15]. In der Darstellung wurde das Diastereomer Cis-Syn herausgegriffen. Dieses tritt bei UV-Belichtung im Genom am häufigsten auf [Mor90] und wurde im Rahmen dieser Arbeit eingehender untersucht. Der Entstehungsmechanismus wird detailliert in der Literatur beschrieben [Sch10, MM05, Sch09, Sch08] und zählt nicht zu den Schwerpunkten dieser Arbeit. Pyr(6-4)Pyr Schäden sind unter UV-Strahlung irreversibel [LR93]. Eine Photoreaktion zu Pyr(Dewar)Pyr ist jedoch möglich [LR93]. Pyr(6-4)Pyr und Pyr(Dewar)Pyr sind Photoisomere und können mit Hilfe von UV-Strahlung ineinander umgewandelt werden [LR93, Hai12].

Das TA Photoprodukt wurde in der Vergangenheit bereits intensiv untersucht [Bos84]. Bis 1996 wurde eine Molekülstruktur vorgeschlagen, welche dem CPD Schaden insofern ähnlich ist, als dass die C5 und C6 Atome, sowohl vom Thymin als auch vom Adenin ihre Doppelbindungen öffnen und einen Ring mit der benachbarten Base bilden [Mor90]. Demzufolge müsste das Molekül auf eine ähnliche Weise photoreversibel sein. Die Tatsache, dass keine derartige Rückreaktion beobachtet wurde, ließ Schlüsse auf Folgereaktionen zu, welche zur dargestellten Molekülstruktur geführt haben [Zha96]. Dabei wird die ursprüngliche Adenin Ringstruktur geöffnet und formt einen 8er Ring. Das abgebildete Molekül stellt dieses Endprodukt dar.

Die Schäden C(4-8)G bzw. G(4-8)C [Mün11] und GT [Mad13] zählen zu den neueren Entdeckungen auf dem Gebiet UV-induzierter Photoschäden. Beide zeichnen sich durch eine einzige kovalente Bindung zum Nachbarmolekül aus. Dabei werden keine der ursprünglichen Ringstrukturen geöffnet.

Bei AA bildet sich, ähnlich den zuvor beschriebenen Cyclobutan-Ringen, zunächst eine Ringstruktur zwischen N7-C6 und C8-C5 aus, welche sich neu anordnet und dabei komplett öffnen kann [Kum91]. Die intermolekulare Bindung zwischen C8 und C5 bleibt erhalten.

Als typische Repräsentanten UV-induzierter Photoschäden an einzelnen DNA-Basen, sind Photohydrate am Beispiel von Cytosin und oxidative Schäden am Guanin aufgeführt. Beide Monomer Schäden werden durch Reaktion mit der Umgebung hervorgerufen. Photohydrate treten bei Pyrimidin-Basen auf [Boo90]. Sie sind thermisch instabil und reagieren wieder in ihre Ausgangsstoffe zurück [LR93]. Auf oxidative Schäden wird in Kapitel 4 näher eingegangen.

Quantenausbeuten Die in Abbildung 2.3 vorgestellten UV-induzierten Schäden unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihrer Häufigkeit. Ein Maß hierfür verkörpert die Quantenausbeute. Diese gibt das Verhältnis zwischen umgesetzten Molekülen und absorbierten Photonen wieder (vgl. Unterabschnitt 3.2.6). Allgemeine Zusammenstellungen verschiedener Photoschäden sind beispielsweise in [Mor90, BBU15b] aufgeführt. Eine Auflistung der Photoschäden mit zugehörigen Quantenausbeuten und verwendeten Belichtungswellenlängen ist für die Übersicht sehr hilfreich und

fehlt in den meisten Referenzen. Die entsprechenden Daten, inklusive der Ergebnisse neuerer Arbeiten, wurden daher in [Tabelle 2.1](#) zusammen getragen. Die Schwierigkeit hierbei liegt in der Gegenüberstellung einer Vielzahl unterschiedlicher Studien mit voneinander abweichenden Messmethoden. Die angegebenen Werte sind daher als Anhaltspunkte für weitere Betrachtungen zu verstehen.

| Photolesion | Quantum Yield | Wavelength / nm | Reference |
|------------------|-----------------------|-----------------|-----------|
| T(CPD)T | $1.3 \cdot 10^{-2}$ | 266 | [MM05] |
| T(CPD)C | $(7 \cdot 10^{-3})^a$ | UVB | [BBU15b] |
| T(6-4) C | $(5 \cdot 10^{-3})^a$ | UVB | [BBU15b] |
| TT Spore Product | $4 \cdot 10^{-3}$ | 254 | [LL10] |
| C(CPD)T | $(3 \cdot 10^{-3})^a$ | UVB | [BBU15b] |
| poly(A) | $2.5 \cdot 10^{-3}$ | 248 | [Pör73] |
| C(CPD)C | $(1 \cdot 10^{-3})^a$ | UVB | [BBU15b] |
| AA | 10^{-3} | 254 | [Kum91] |
| T(6-4) T | $8 \cdot 10^{-4}$ | 266 | [MM05] |
| TA | $5 \cdot 10^{-4}$ | 254 | [Mor90] |
| poly(TA) | $3.8 \cdot 10^{-4}$ | 254 | [Mor90] |
| T Photohydrate | $3 \cdot 10^{-4}$ | 254 | [Gör91] |
| C(6-4) T | $(10^{-4})^a$ | UVB | [BBU15b] |
| C(6-4) C | $(10^{-4})^a$ | UVB | [BBU15b] |
| 8-OxoG | $5 \cdot 10^{-5}$ | 266 | [Gom16] |
| TA (Genome) | $1 \cdot 10^{-5}$ | 254 | [Mor90] |
| C(4-8) G | $(10^{-5})^a$ | 254 | [Mün11] |
| G(8-4) C | $(10^{-5})^a$ | 254 | [Mün11] |
| GT | 10^{-6} | 266 | [Mad13] |
| 8-OxoA | $(< 10^{-5})^b$ | 266 | [Ber10] |

Tabelle 2.1.: Experimentell bestimmte Quantenausbeuten typischer UV-induzierter Photoschäden. Skalierte Quantenausbeuten gemäß a) [MM05](#), b) [Ber10](#).

Die Photoschäden wurden nach ihrer ungefähren Quantenausbeuten sortiert. Horizontale Trennlinien grenzen die Größenordnungen ab. Zu beachten sind dabei die unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Der T(CPD)T Schaden sticht durch die höchste Quantenausbeute im Prozent-Bereich hervor [MM05]. Insgesamt sind unter den häufigsten Photoschäden vorwiegend Pyrimidin-Dimere zu finden. Bei allen Pyrimidin-Dimer-Kombinationen tritt innerhalb derselben Studie der CPD Schaden häufiger als der Pyr(6-4)Pyr Schaden auf [BBU15b]. Die zugehörigen Daten wurden zur Vergleichbarkeit mit den Referenzwerten aus [MM05] skaliert und sind daher in Klammern aufgeführt. C(CPD)C Schäden sind etwa eine Größenordnung seltener als

T(CPD)T Schäden. Die beiden Dimere TC und CT zeigen eine deutliche Sequenzabhängigkeit. So ist die Quantenausbeute des T(CPD)C Schadens etwa doppelt so hoch wie die des C(CPD)T Schadens. In Bezug auf die Pyr(6-4)-Pyr Schäden, dominiert die Sequenz T(6-4)C mit einer höheren Quantenausbeute als C(CPD)T. Das AA-Dimer nimmt mit einer Schädigungs-Quantenausbeute in der Größenordnung von 10^{-3} eine besondere Rolle gegenüber den sonst eher photoresistenten Purin-Dimeren ein. Oxidative Schäden, wie zum Beispiel 8-OxoG, welche bei Purinen häufiger auftreten als bei Pyrimidinen [BBU15b], sind etwa um einen Faktor 100 seltener. Dabei tritt 8-OxoG häufiger auf als 8-OxoA [Ber10]. Hintergründe sind die entsprechenden Redoxpotentiale (Tabelle 3.1). In der Größenordnung von 10^{-4} finden sich neben den selteneren Pyr(6-4)Pyr Schäden außerdem das TA Dimer und Photohydrate. Die Bestimmung der Quantenausbeute des Photohydrates wird durch dessen Instabilität erschwert [RDC01]. Anders als beim AA Dimer, nimmt die Häufigkeit der TA-Dimere mit steigender Oligonukleotidlänge ab. Mit Quantenausbeuten in der Größenordnung von 10^{-5} , vergleichbar zu den oxidativen Schäden, treten die G(8-4)C und C(4-8)G Dimere auf. Einen Faktor 10 seltener entsteht das GT Photoprodukt. Unter der laufenden Weiterentwicklung der Messverfahren ist zu erwarten, dass künftig tiefere Einblicke in sehr seltene Photoprodukte gewonnen werden können.

In Pflanzensporen wurden bei UV-Belichtung Sporenprodukte gefunden. Hierbei handelt es sich um Thymin-Dimere mit Quantenausbeuten im Bereich von 10^{-3} [LL10]. Da Sporenprodukte nur unter speziellen Bedingungen entstehen [DS65], wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen.

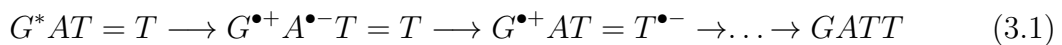
3. Selbstreparatur

Im ersten Teil dieser Arbeit soll auf die Fragestellung eingegangen werden, inwiefern die UV-Absorption benachbarter Basen einen vorhandenen Photoschaden reparieren kann. Kern der Untersuchungen ist der T(CPD)T Schaden, welcher durch seine Häufigkeit gegenüber anderen Photoschäden heraussticht [LR93]. Im Folgenden wird synonym für T(CPD)T auch die abgekürzte Schreibweise „T=T“ verwendet.

3.1. Ausgangspunkt und Fragestellung

Bei Absorption eines Photons im UV-Bereich kann T=T zu einem geringen Anteil direkt in intaktes TT umgewandelt werden [HIR07]. Dass umgebende DNA-Basen diesen Sachverhalt beeinflussen können, wurde bei einer sich am Komplementärstrang befindlichen G-Quadruplex-Struktur beobachtet [CS04]. Aufgrund der Reparatur nach selektiver Anregung des Quadruplexes bei 305 nm, wurden Parallelen zum enzymatischen Photolyase-Mechanismus gezogen [San16]. Bei diesem Reparaturmechanismus absorbiert das Photolyase-Enzym zunächst ein sichtbares Photon, aufgrund dessen eine Ladungstrennung im Molekül stattfindet. Das Elektron geht dabei auf den T=T Schaden über, öffnet diesen und rekombiniert schließlich wieder [San16]. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch darin, dass im Fall der Quadruplex-Studie [CS04] der Komplementärstrang selbst die Funktion des Enzyms übernimmt und keine weiteren Moleküle dafür erforderlich sind.

Dass direkt benachbarte Basen auch die Funktion einer strangintrinsischen Selbstreparatur ausführen können, wurde von Bucher et al. [Buc16] an der Sequenz GAT=T erstmals beobachtet. Dieser Prozess ist aufgrund seiner niedrigeren Komplexität von besonderer Relevanz für die präbiotische Entwicklung des Lebens. Der dabei ablaufende Mechanismus ist dem Photolyase-Mechanismus ähnlich in Bezug auf den Ladungstransfer. Hervorgerufen wird dieser durch langlebige ladungsgetrennte Zustände (Charge Transfer, CT) zwischen den beiden benachbarten Basen nach UV-Anregung (*). Im genannten Beispiel entsteht ein Radikalpaar aus einem G-Radikal-Kation ($G^{\bullet+}$) und einem A-Radikal-Anion ($A^{\bullet-}$). Das Elektron des Anions geht auf den T=T Schaden über, was dessen Reparatur einleitet. Theoretisch untermauert wurde der Mechanismus kürzlich durch Szabla et al. [Sza18] (3.1).



Die Abwesenheit eines langlebigen CT Zustandes auf dem Dinukleotid TA erklärt das Ergebnis, dass bei der Sequenz TAT=T keine Reparatur beobachtet wurde. Aufbauend auf diesen Resultaten sind Teile der Veröffentlichung [Buc16] zu symmetrischen Sequenzen, wie etwa GAT=TAG, und zum Verhalten von doppelsträngigen Sequenzen im Rahmen dieser Arbeit entstanden. Bei den Untersuchungen zeigten einzelne Sequenzen zum Teil starke Unterschiede in ihrem Schädigungs- und Reparaturverhalten. Dies warf die Frage nach der zu Grunde liegenden Systematik auf. Wonach bemisst sich die Stärke des beobachteten Reparaturverhaltens? Welche Faktoren sind für die Reparatur entscheidend? Diesen Fragen wurde im folgenden Kapitel durch systematische Variation der Sequenzen und eingehende Charakterisierung der Schädigung und Reparatur, sowie der entsprechenden CT Zustände nachgegangen.

3.2. Methode und Vorgehensweise

3.2.1. Auswahl der Proben

Aufbauend auf die Reparatur-Eigenschaften von GAT=T [Buc16], wurden im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen auf Sequenzen der symmetrischen Struktur XYT=TYX ausgeweitet. Die Buchstaben X und Y stehen dabei symbolisch für verschiedene Kombinationen aus den kanonischen DNA-Basen A, C, T und G (vgl. [Abbildung 1.1](#)). Die symmetrische Anordnung wurde gewählt, um die Einflüsse der Nachbarbasen auf den T(CPD)T Schaden zu erhöhen, in dem die Möglichkeit entsteht, sowohl vom 5' als auch vom 3' Ende der Sequenz mit dem Schaden in Wechselwirkung zu treten. Das Redoxpotential der Nachbarbasen und die Lebensdauer des angeregten Zustandes bestimmen die Reaktivität des Radikalpaares. Berechnete Reduktions- und Oxidationspotentiale der vier kanonischen DNA-Basen nach [PH11] sind in [Tabelle 3.1](#) gegenübergestellt. Daraus geht hervor, dass G über das niedrigste Oxidationspotential verfügt. Durch Abgabe eines Elektrons an die Umgebung kann G zum $G^{\bullet+}$ werden.

| DNA-Base | Reduktionspotential / V | Oxidationspotential / V |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| G | -2.97 | 1.41 |
| A | -2.77 | 1.78 |
| C | -2.36 | 2.11 |
| T | -2.31 | 2.01 |

Tabelle 3.1.: Reduktions- und Oxidationspotentiale der DNA-Basen [PH11].

Im Fall von GA existiert ein relativ langlebiger ladungsgetrennter Zustand $G^{\bullet+}A^{\bullet-}$ mit einer Lebensdauer von ca. 300 ps [Buc14a]. Im Dinukleotid TA lebt der ladungsgetrennte Zustand $T^{\bullet-}A^{\bullet+}$ 50 ps [Pil14a], was dazu führt, dass in der Sequenz

TAT=T keine Reparatur, sondern sogar zusätzliche Schadensbildung beobachtet wurde [Buc16]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen auf die in [Tabelle 3.2](#) aufgelisteten Sequenzen ausgeweitet.

| Sequenz | Zielsetzung |
|----------------|---|
| T=TAG | Einflüsse des 3' Endes. |
| GAT=TAG | Einflüsse beider Enden [Buc16]. Vgl. zu DS GAT=TAG. |
| AGT=TGA | Unterschiede zu GAT=TAG. |
| GT=TG | Vergleich zu GT=T und T=TG [Pan12]. |
| GAAT=TAAG | Reparatureffekte über 2 Basen hinweg. |
| AAT=TAA | Vergleich zu GAAT=TAAG. |
| GGT=TGG | G als Radikal-Anion. |
| GCT=TCG | Kombination G mit einem Pyrimidin. |
| GAT=TAG_CTAATC | Intrastrang Reparatur [Buc16]. |
| GATTAG_CTAATC | Vergleich zu GAT=TAG_CTAATC [Buc16]. |
| GATTAG | Vergleich zu GATTAG_CTAATC [Buc16]. |
| CTAATC | Vergleich zu DS GAT=TAG u. DS GATTAG [Buc16]. |
| ACT=TCA_TGAAGT | Interstrang Reparatur. |
| ACTTCA_TGAAGT | Vergleich zu ACT=TCA_TGAAGT. |
| ACT=TCA | Vergleich zu ACT=TCA_TGAAGT. |
| ACTTCA | Vergleich zu ACTTCA_TGAAGT. |
| TGAAGT | Vergleich zu DS ACT=TCA und DS ACTTCA. |

Tabelle 3.2.: Auflistung der in [Kapitel 3](#) untersuchten Proben mit zugehörigen Zielsetzungen. Doppelsträngige Sequenzen (DS) wurden mit Hilfe eines HEGL (__) verknüpft.

Die Sequenz T=TAG diene als Ergänzung zu den Proben GAT=T und GAT=TAG, um die Reparatur-Eigenschaften benachbarter Basen am 3' Ende der Sequenz abzugrenzen. Ob bei einem direkt an den T(CPD)T Schaden angrenzenden G Reparatur auftritt, sollte mit den Sequenzen AGT=TGA und GT=TG ermittelt werden. Die Sequenzen GT=T und T=TG wurden in anderem Zusammenhang bereits untersucht [Pan12]. Die Probe GT=TG diene dem Vergleich. In Anlehnung an den Ladungstransport über mehrere Basen hinweg [Mur93, Buc14a] sollte anhand der Sequenz GAAT=TAAG der Einfluss des Abstandes eines ladungsgetrennten Radikalpaares von der Schadensstelle untersucht werden. Direkt im Vergleich dazu stehen Untersuchungen der Sequenz AAT=TAA, ohne angrenzendes G. Aufgrund seines niedrigen Oxidationspotentials verfügt G in den angesprochenen Radikalpaaren über die Tendenz durch Elektronenabgabe zum $G^{\bullet+}$ zu werden. Die Fragestellung, ob G auch als Radikal-Anion in der Lage ist, benachbarte T(CPD)T Schäden zu reparieren, wird durch die Sequenz GGT=TGG angesprochen. Einflüsse eines Pyrimidins in direkter Nachbarschaft zum Schaden wurden anhand der Sequenz GCT=TCG untersucht.

Die Ergebnisse der Sequenzen GAT=TAG, DS GAT=TAG, DS GATTAG, GATTAG und CTAATC wurden in Zusammenhang mit dieser Arbeit veröffentlicht [Buc16]. Der direkte Vergleich zwischen GAT=TAG und dem zugehörigen Doppelstrang (DS) GAT=TAG_CTAATC diente der Differenzierung der Einflüsse der Doppelstrang-Struktur auf die Reparatur innerhalb eines Stranges (Intrastrang-Reparatur). Hierzu wurden die korrespondierenden Komplementärstränge durch einen Hexaethylen-Glykol-Linker (HEGL) zu einer Haarnadel-Struktur verknüpft. Die intakte Doppelstrang-Probe GATTAG_CTAATC und die zugehörigen Einzelstränge GATTAG und CTAATC dienten als Referenzen. Ob langlebige ladungsgetrennte Zustände auch über Watson-Crick-Basenpaarungen hinweg eine reparierende Wirkung haben können (Interstrang-Reparatur), wurde mit der Sequenz ACT=TCA_TGAAGT untersucht. Die Basenzusammensetzung blieb die gleiche, die beiden Purin-Paare GA und AG wurden jedoch auf den Gegenstrang gegenüber zum CPD platziert. Die geschädigte Sequenz wurde ebenfalls mit der intakten doppelsträngigen Sequenz ACTTCA_TGAAGT und den zugehörigen Einzelsträngen ACTTCA und TGAAGT verglichen.

Die einzelsträngigen Sequenzen AGT=TGA und GT=TG wurden im Rahmen der Veröffentlichung [Buc16] als Zusatzmaterial aufgeführt. Massenspektroskopische Untersuchungen nach der Veröffentlichung ergaben herstellungsbedingte Fehler in den Proben, welche auf die sehr schwierige und aufwendige Synthese zurückzuführen sind. Die doppelsträngigen Proben und die Proben, welche in Zusammenhang mit der oben genannten Veröffentlichung stehen, sowie GCT=TCG wurden kommerziell erworben (*iba Lifesciences*). Alle weiteren Proben, bei denen eine Purin-Base an den T(CPD)T Schaden angrenzt, wurden mit Hilfe von Sensitizing aus intakten Sequenzen selbst hergestellt (Unterabschnitt 3.2.3).

In der Arbeit [Buc16] wurden die Sequenzen GAT=T, AT=T und TAT=T untersucht. Dabei zeigte GAT=T starke Reparatur, welche bei der verkürzten Sequenz AT=T fehlten. Auch eine Substitution des Guanins durch Thymin führte zu zusätzlicher Schädigung. Auf Basis der beobachteten starken Reparatur der GAT=T Sequenz wurden weitere Untersuchungen an Guanin und Adenin enthaltenden Sequenzen durchgeführt. So wurde die Frage nach unterschiedlichen Reparatureigenschaften durch die Position der Nachbarbasen am 5' bzw. 3' Endes der Sequenz untersucht.

3.2.2. Analytische Verfahren

Vor der detaillierten Beschreibung der Probenherstellung werden zwei analytische Verfahren skizziert, die zur Aufreinigung und Qualitätskontrolle eingesetzt wurden. Es handelt sich um HPLC und MALDI-TOF, welche durch freundliche Unterstützung der Arbeitsgruppe Carell im Chemie-Department der LMU München für diese Arbeit genutzt werden durften. Besonderer Dank gilt hier M. Sc. Matthias Q. Kurz für die Durchführung der Messungen an den jeweiligen Geräten.

HPLC Die Reinheit aller kommerziell erworbenen kurzen Oligonukleotide wurde durch analytische High Performance Liquid Chromatography (HPLC) überprüft (*Auftrennungsmodul: Alliance e2695, UV-Detektion: 2489, Waters*). Hierzu wurde eine Menge von mindestens 500 pmol der Probe auf eine chromatographische Säule (*NUCLEODUR 100-3 C18ec: 250 * 4 mm, particle size 3 μ m, Macherey Nagel*) aufgetragen und mit einer Flussrate von 0.5 ml / min aufgetrennt. Zur Auftrennung von Komponenten unterschiedlicher Polarität wurden zwei unterschiedliche Puffer eingesetzt: Puffer A (0.1 M Triethylammonium Acetat (TEAA) in H_2O) und Puffer B (0.1 M TEAA in H_2O / MeCN 20/80). Zwischen den Puffern wurde ein Gradient von 0% auf 25% von Puffer B in 45 min eingestellt. Von den Proben wurde eine Stoffmenge von 0.5 nmol mit Puffer A auf ein Gesamtvolumen von 53 μ l verdünnt, wovon wiederum 50 μ l für die Analyse verwendet wurden. Die Absorbanz der durchströmenden Probe bei 260 nm am Ausgang wurde gegen die Retentionszeit seit dem Zeitpunkt der Probenauftragung auf die Säule aufgezeichnet. Fraktionen der Probe bei unterschiedlichen Retentionszeiten geben Aufschluss über die Zusammensetzung der Probe. Je nach Reinheitsgrad ergaben sich ein oder mehrere Maxima in den Chromatogrammen. Als Reinheitskriterium in den UV-Spuren wurde ein Flächenverhältnis von weniger als 10% zur Hauptfraktion angesetzt.

MALDI-TOF Die Zusammensetzung der Proben wurde massenspektroskopisch mit *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* (MALDI-TOF) kontrolliert. Als Matrix wurde 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) verwendet. Auf einen leitenden Objektträger wurden zunächst der Probenzahl entsprechend 0.5 μ l HPA-Tröpfchen in ausreichendem Abstand pipettiert. Diese wurden über einen Zeitrahmen von ca. 10 min luftgetrocknet. Auf die trockenen HPA Kristalle wurde in einem zweiten Durchgang 0.5 μ l Proben-Tröpfchen der Konzentration 0.1 mM pipettiert. Die Proben lösten die Matrix an der Oberfläche an, vermischten sich mit dieser und wurden anschließend ebenfalls luftgetrocknet. Der getrocknete Objektträger wurde mit einem High-Performance MALDI-TOF System (*autoflex II, Bruker*) gemessen. Nach Evakuierung der Probenkammer und Anlegen von Hochspannung wurden die Probenpunkte mit einem Laser der Wellenlänge 337,1 nm desorbiert und die Flugzeit der freien Moleküle im elektrischen Feld wurde ermittelt. Entsprechend ihrer Flugzeiten wurden die Proben von der System-Software direkt in ihre zugehörigen Molekülmassen mit einer Präzision von ± 7 Da umgerechnet. Da die Desorption der Proben von mehreren zusätzlichen Faktoren, wie etwa der Matrix und den untersuchten Stellen, abhängt, diente die Methode lediglich dem qualitativen Nachweis der gesuchten Spezies. Als solche wurde sie zur zusätzlichen Kontrolle der HPLC-Ergebnisse herangezogen.

3.2.3. Probenherstellung

Zur Herstellung der T(CPD)T Schäden wurde bei einigen Proben Aceton als Photosensitizer eingesetzt [Mor90]. Photosensitizing basiert auf dem Prinzip einer Triplett-Energieübertragung eines angeregten Sensitizer-Moleküls auf ein vorhandenes Substrat [Liu16a]. Im Vergleich zum in [Liu16b] vielfach verwendeten 2'-Methoxyacetophenon (2M), erzeugt Aceton unter den in [Uml85] verwendeten Bedingungen ausschließlich Cis-Syn-T(CPD)T-Schäden [CV90]. Ein weiterer Vorteil von Aceton gegenüber 2M ist die leichtere Abtrennbarkeit des Sensitizers nach der Belichtung. Mit Hilfe der Sensitizing-Methode entfällt der schwierige Synthese-Schritt, einen T(CPD)T geschädigten Baustein in eine intakte Sequenz einzubauen. Stattdessen konnte mit leicht zu handhabenden intakten DNA-Sequenzen als Ausgangsprobe gearbeitet werden. Dies vereinfachte den Zeit- und Kostenaufwand deutlich und lieferte ausreichende Mengen der zu untersuchenden Proben. Sequenzbedingt konnten jedoch nur die Proben TTAG, AGTTGA, GAATTAAG, AATTAA und GTTG mittels Sensitizing hergestellt werden. Bei Proben mit weiteren Pyrimidinen neben der zu schädigenden Stelle, wie zum Beispiel ACTTCA, führt das Sensitizing zu einer Vielzahl von CPD Schäden. Darunter sind auch Schäden wie AC=TTCA oder ACTT=CA zu erwarten, welche vom gewünschten ACT=TCA schwer zu trennen sind. Deshalb wurde die Auswahl auf Sequenzen mit Purinen neben der Schadensstelle eingeschränkt.

Experimentell wurde bei hohen Aceton-Konzentrationen eine Ausfällung der DNA beobachtet. Die in [CV90] beschriebene wässrige Aceton-Lösung von 20% wurde daher mit besonderer Sorgfalt hergestellt. Zu 120 µl wässriger DNA-Lösung der Konzentration 1 mM wurden in einem separaten Reaktionsgefäß 30 µl spektroskopisch reines Aceton (*Sigma Aldrich*) langsam tröpfchenweise unter stetigem Umrühren zugefügt. Dabei wurde kein Puffer eingesetzt.

Als Belichtungsgefäß wurde eine Quarz-Küvette der Schichtdicke 1 mm (*Hellma*) verwendet. Eine gleichmäßige Durchmischung der Proben während der Belichtung gestaltete sich mit handelsüblichen Magnetrührern aufgrund der geringen Küvetten-dicke als schwierig. Daher wurde für diese Anwendung ein Magnetrührer von wenigen Millimetern Länge aus sehr dünnem Federstahldraht und einer Polytetrafluorethan (PTFE) Ummantelung hergestellt. Eine Herausforderung stellte dabei die Abdichtung der Ränder gegenüber der Probe dar. Versuche mit Heißkleber zur Abdichtung führten zu einer Wechselwirkung der Probe mit dem Dichtungsmaterial und wurden daher verworfen. Als zielführend erwies sich, die überstehende PTFE-Ummantelung mit Hilfe einer heißen Lötspitze zu versiegeln. Zu Beginn der Belichtungsreihen wurden sowohl die Küvette als auch der Magnetrührer mit spektroskopisch reinem Aceton für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Zwischen den Belichtungen wurde beides je zweimal mit spektroskopisch reinem Wasser und anschließend zweimal mit spektroskopisch reinem Aceton gespült. Vor dem Einfüllen in die Küvette wurden

sämtliche Proben mit einem handelsüblichen Wirbelmischer < 10 s durchmischt und anschließend kurz ab zentrifugiert.

Als Lichtquelle diente ein ns-gepulstes Laser / parametrischer Oszillator System (*NT 242, EKSPLA*) mit einer Repetitionsrate von 1 kHz. Mit diesem wurde bei einer Wellenlänge von 313 nm [Uml85] für eine Dauer von 1 h belichtet. Die durchschnittliche Leistung betrug 12 bis 13 mW bei einem Belichtungsfleck-Durchmesser von ca. 7 mm.

Das Flüssigkeitsvolumen wurde während der Belichtung permanent durch einen an der Rückseite angebrachten Magnetührer ausgetauscht (vgl. Dom15). Die angelegte Spannung am Drehmotor betrug 9 V. Die Küvette wurde repositionierbar und stets mit derselben Ausrichtung gegenüber dem Strahlengang belichtet. Nach der Belichtung wurde die belichtete Probe mit einer Spritze aus der Küvette entnommen. Die Entnahme erfolgte am Küvettenrand, da sich aufgrund der Nadel leichte Kratzspuren am Küvettenglas nicht vermeiden ließen. Die Lagerung aller Proben außerhalb der Messungen erfolgte bei -80°C . Folgereaktionen oder Degradation der Proben sollten somit minimiert werden. Die Zeitintervalle zwischen der Messung und dem Auftauen bzw. Einfrieren der Proben betrugen jeweils höchstens 15 min.

Die Aufreinigung der belichteten Proben erfolgte am Lehrstuhl Carell am Chemie-Department der LMU München. Im ersten Schritt wurden die Proben mit Hilfe eines Vakuum Konzentrators (*RVC 2-33 IR, Christ*) für 10 min bei 60°C aufkonzentriert. Die Abkühlung der Probe beim Verdunsten sorgte für geringe thermische Belastung der Proben während des Vorgangs. Bei dem Prozess verdunstete neben Wasser auch bereits ein Großteil des Acetons. Anschließend wurden die Proben für die HPLC auf Volumina von 53 μl verdünnt und von M. Sc. Matthias Q. Kurz bei einem HPLC-Puffergradienten von 0 auf 20% aufgetrennt und in separaten Reaktionsgefäßen aufgefangen. Aufgrund der geringen Probenmengen und der höheren Genauigkeit wurde hierfür die oben genannte analytische HPLC, anstelle eines präparativen HPLC-Gerätes, eingesetzt. Kleine Mengen der aufgefangenen Fraktionen wurden daraufhin abermals durch die analytische HPLC auf Reinheit kontrolliert. Im nächsten Schritt wurden die Fraktionen entsprechend ihrer Zusammensetzung vereinigt. Eine MALDI-TOF Überprüfung gab Auskunft über die Massen der vereinigten Fraktionen. Mittels variabler Einkanalpipetten (*eppendorf*) wurden die Volumina der gewünschten Fraktionen bestimmt. Aufschlüsse über vorhandenen Konzentrationen gab die Messung der optischen Dichte an einem Spektralphotometer (*ND-1000, NanoDrop*). Daraus wurde die bei der Belichtung entstandene Stoffmenge errechnet. Das nach wie vor Acetonitril-haltige Lösungsmittel wurde am Ende durch Lyophilisation entfernt (*Alpha 2-4 LD plus, Christ*). Mit dieser Methode wurden im Rahmen dieser Arbeit die Proben AGT=TGA, T=TAG, GAAT=TAAG, GT=TG und AAT=TAA hergestellt.

3.2.4. Probenpräparation

Die Vorbereitung der T(CPD)T Proben zielte auf homogene, blasen- und staubfreie Proben für die Belichtungsexperimente ab. Zwei Maßnahmen führten im Rahmen dieser Arbeit zur erheblichen Verbesserung der Versuchsbedingungen: Das Aliquotieren sämtlicher verwendeter Lösungsmittel führte zu einer deutlichen Staubreduktion, da Gefäße nur wenige Male geöffnet werden mussten. Die kurze Wirbeldurchmischung und das anschließende Zentrifugieren ermöglichte homogene und blasenfreie Proben. Darüber hinaus wurde stets auf kurze Zeitintervalle zwischen den Messungen und den jeweiligen Auftau- und Einfrier-Vorgängen auf -80°C geachtet. Alle im Zusammenhang mit diesem Kapitel verwendeten Pufferlösungen wurden am betreffenden Versuchstag frisch hergestellt.

Das verwendete spektroskopisch reine Wasser und Aceton wurden aus Vorratsgefäßen in Mengen von wenigen ml in separate Zentrifugenröhrchen abgefüllt. In vergleichbaren Gefäßen wurde die Pufferlösung aliquotiert. Ähnlich den Bedingungen in natürlichen Systemen, wurde eine wässrige Phosphatpufferlösung der Endkonzentration nahe 50 mM KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 mit 0.5 mM NaCl (*Sigma-Aldrich*) bei $\text{pH} = 7$ eingesetzt. Bei der Herstellung wurde das Gesamtvolumen nach dem Zufügen der Probe mit berücksichtigt.

Die Proben wurden kurz vor der Verwendung auf 0.1 mM in spektroskopisch reinem Wasser aufgelöst. Eine Gesamtmenge von je 30 nmol pro Probe wurde im Reaktionsgefäß mit jeweils 1600 μl Puffer verdünnt. Diese Menge wurde als Probe und Referenz zu je 800 μl auf zwei gleichartige Küvetten aufgeteilt. Als Küvetten wurden je zwei 10 mm Quarz-Küvetten (*114B-10-40, Hellma*) verwendet. Durch die reduzierte Breite von 4 mm konnten die benötigten Probenvolumina verringert werden. Schwarze Küvettenränder verhinderten außerdem Messfehler aufgrund der Durchleuchtung der Seitenwände. Während der Belichtung wurden die Proben mit kommerziellen Magnetrührern der Größe 7 x 1.5 mm umgerührt. Die zu belichtende Probe wurde zuerst pipettiert, die Referenz folgte. So wurde ein möglichst genaues Probenvolumen für die Belichtung eingestellt. Nach dem Befüllen der Küvetten erfolgte eine Sichtkontrolle auf Luftblasen oder Verunreinigungen durch Staub. Die Küvetten wurde nach der in [Unterabschnitt 3.2.3](#) beschriebenen Prozedur gereinigt.

3.2.5. Belichtungsexperimente

Die Belichtungsexperimente wurde mit einem in [Abbildung 3.1](#) schematisch dargestellten Belichtungsaufbau durchgeführt. Als Lichtquelle diente ebenfalls das frequenzabstimmbare Lasersystem (*NT 242, EKSPLA*). Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 290 nm mit einer spektralen Breite von ca. 3 nm belichtet. Die transmittierte Leistung hinter der Küvette wurde von einem thermischen Messkopf D1 (*3A, Ophir*) gemessen. Photodiode D2 (*PD300-UV, Ophir*) diente der Überwachung der eingestrahnten Laserleistung durch die Aufzeichnung der an einem eingebrachten

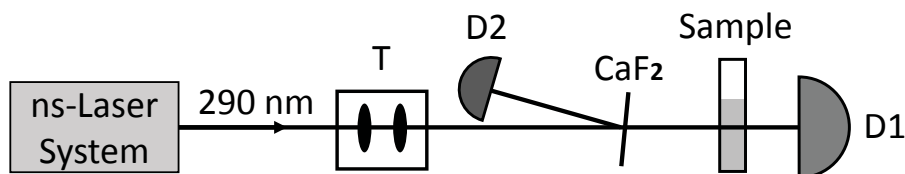


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung des für die Belichtungsexperimente verwendeten Aufbaus.

CaF_2 -Plättchen reflektierten Leistung. Das vom Lasersystem emittierte Licht verfügte über ein asymmetrisch divergentes Strahlprofil. Das Korrekturteleskop T wurde verwendet, um eine vollständige Durchleuchtung der Küvette ohne Verluste durch ein Abschneiden des Belichtungsflecks durch den Küvettenrand oder den verwendeten Magnetprüher zu gewährleisten.

Als Belichtungswellenlänge wurden 290 nm gewählt. Ziel dabei war, die T(CPD)T Schadstelle nach Möglichkeit nicht direkt anzuregen und stattdessen eine selektive Anregung der benachbarten Basen zu gewährleisten (vgl. [Abbildung 1.2](#)). Die Reparaturaktivität der einzelnen Proben wurde mit Hilfe von UV-Vis-Spektroskopie ermittelt. Hierzu wurde ein *Shimadzu UV 1800* Spektralphotometer eingesetzt. Gemessen wurde jeweils auf 2 Kanälen mit einer belichteten Proben- und einer unbelichteten, aber ansonsten identisch behandelten Referenzküvette. Die Differenzspektren wurden zur Auswertung herangezogen. Zur Reduktion von Messfehlern wurden je zwei Differenzspektren gemittelt. Als Untergrund wurde das gemittelte Differenzspektrum vor dem Beginn der Belichtungen abgezogen. Systematische Schwankungen der Basislinie wurden in der Auswertung durch Abzug des Untergrundes bei rund 360 nm korrigiert.

Beide Küvetten wurden während der Belichtung von Magnetprühern durchmischt. Die angelegte Spannung am Magnetprühremotor (*IG160004-3A403R, Modelcraft*) betrug 12 V. Während der Messungen wurde das Spektralphotometer auf einem separaten Tisch gelagert. Eine schwere Grundplatte, welche zusätzlich auf Filzstücken gelagert wurde, reduzierte die an das Gerät übertragenen mechanischen Schwingungen. Während der Messungen wurde mechanischer Kontakt zum Messtisch vermieden. Vor der Messung wurden sowohl der Belichtungslaser als auch das Spektralphotometer zur Stabilisierung einer Aufwärmphase von etwa einer Stunde unterzogen. Vor dem Einsatz des Spektralphotometers wurde einmalig eine Selbst-Kalibrierung (Instrument Baseline Correction) durchgeführt. Zu Beginn jeder Messreihe wurde darüber hinaus eine Autozero- und eine Baseline-Korrektur durchgeführt. Als Messeinstellung wurde langsame Scangeschwindigkeit in 1 nm Schritten zwischen 200 nm und 360 nm gewählt. Umfassende Testexperimente zu unterschiedlichen Scangeschwindigkeiten, Mittelung und Sedimentation der Probe lieferten Hinweise auf die Vorteile dieser Einstellungen. Das Spektralphotometer verfügt über eine Deuterium- und eine Wolfram-Lampe für unterschiedliche Messbereiche. Eingesetzt wurde lediglich die Deuterium-Lampe. Die Wellenlänge des Lampenwechsels wurde hierzu manuell auf einen Wert außerhalb des

Messbereichs gelegt, um dadurch verursachte Störungen zu vermeiden. Die spektrale Auflösung betrug 1.0 nm.

Die Belichtung der Probe fand außerhalb des Spektralphotometers statt. Repositionierfedern in den Küvettenhaltern ermöglichten gleiche Belichtungs- bzw. Rühr- und Messeinstellungen trotz häufiger Positionswechsel der Küvetten. Durch Sichtkontrollen konnten durch Luftblasen oder Staubflocken hervorgerufene Effekte ausgeschlossen werden. Bei der Probenpräparation ließ sich, trotz sorgfältiger Vorkehrungen, aufgrund der Laborbedingungen ein gewisser Staubanteil nicht vermeiden. Es zeigte sich, dass die Ablagerung makroskopischer Staubpartikel wesentlich schneller erfolgte als eine Sedimentation der Probe. Das durchleuchtete Messfenster im Spektralphotometer befand sich auf einer Höhe zwischen 10 und 20 mm bei einem Flüssigkeitsfüllstand der Küvetten von 20 mm. Staubpartikel, welche sich im Aufnahmezeitfenster von ca. 1 min durch das Messfenster bewegten, zeichneten sich als Untergrund-Änderungen im langwelligen Bereich des Spektrums ab. Messungen mit derartigen Effekten wurden mit Wartezeiten von 1 bis 2 min wiederholt. Die Durchmischung der Proben und der Pipettiervorgang beeinflussten den Anteil gelöster Gase in der Proben. Ohne anschließende Zentrifugation traten in der Regel nach einem Zeitfenster von ca. 4 min feine Anlagerungen von Gasblasen innen an den Küvettenfenstern auf. Kurzes Zentrifugieren bei der Probenpräparation verschaffte dagegen Abhilfe. In manchen Fällen ließ sich eine Gasblasenbildung am Magnetrührer jedoch nicht vermeiden. Diese trat insbesondere beim Einfüllen der Proben in die Küvetten oder nach längerer Rührzeit auf. Am Magnetrührer entstandene Glasblasen konnten leicht von außen durch Bewegung des Rührers mit einem zusätzlichen Magneten entfernt werden. Regelmäßige Sichtkontrollen zwischen den Messprozessen halfen Störeinflüsse durch Gasblasenbildung während der Messung auszuschließen.

Störungen durch Staubpartikel Trotz sorgfältiger Arbeitsweise bei der Probenpräparation (vgl. [Unterabschnitt 3.2.4](#)) ließen sich Staubeinschlüsse in den Probenlösungen nicht gänzlich vermeiden. Diese hatten in erster Linie Einfluss auf die Differenzspektren zu Beginn der Messungen. Die Datenaufnahme im Spektralphotometer erfolgte über einen Zeitraum von etwa 40 s. Die magnetische Durchmischung der Proben wurde für die Aufnahme der Spektren unterbrochen. Die Sedimentation kleiner Staubpartikel verlief in der Größenordnung von Minuten nach der Entfernung des Rührmotors. Das vom Spektralphotometer durchleuchtete Messfenster befand sich in einer Höhe zwischen 10 und 20 mm, vom Küvettenboden gemessen. Sedimentation von Staubpartikeln in diesem Bereich wurde in den Differenzspektren durch einen sich während der Messung verändernden Untergrund sichtbar. Dies erschwerte die Auswertung erheblich. Bei neueren Messreihen wurden daher entsprechende Messungen nach circa einminütiger Wartezeit wiederholt. Frühere Messreihen konnten aus diesem Grund zum Teil nicht auf 360 nm Untergrund korrigiert werden. In diesen Ausnahmefällen wurden die Differenzspektren auf einen Wert nahe 304 nm

korrigiert. In diesem Bereich liegen Banden, die Hinweise auf die Entstehung des T(6-4)T Schadens geben. Diese sind jedoch klein im Vergleich zu den Auswirkungen der Untergrund-Korrektur und werden daher nicht eingehender diskutiert.

Instabilität der Laserleistung Die Einflüsse von Instabilitäten der Belichtungsleistung wurden im Rahmen von [Buc16] noch nicht genauer untersucht. Zunehmende Temperaturschwankungen des zugehörigen Kühlsystems und Degradierung der optischen Komponenten erhöhten kontinuierlich die Instabilität der Laserleistung. Als zusätzlich Maßnahme wurde daraufhin ein zweiter Detektor (D2 in [Abbildung 3.1](#)) zur Überwachung der Eingangsleistung eingeführt. Die aufgezeichneten Daten wurden auf das Niveau der transmittierten Leistung ohne Küvette skaliert ([Abbildung 3.2](#)).

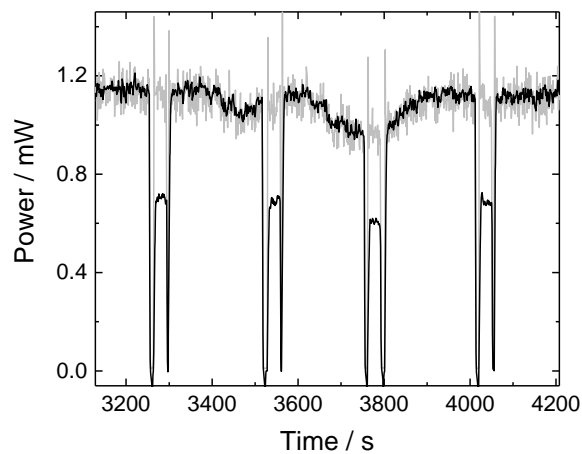


Abbildung 3.2.: Exemplarischer Ausschnitt der transmittierten Laserleistung während der Belichtung (schwarze Kurve, D1 in [Abbildung 3.1](#)). Die an einem CaF_2 -Plättchen reflektierte Eingangsleistung (D2 in [Abbildung 3.1](#)) wurde entsprechend skaliert (graue Kurve).

Der Überlapp beider Kurven in den Zeitfenstern ohne eingesetzte Küvette diente der Kontrolle. Während der Belichtungsphasen gibt die graue Kurve Auskunft über die Eingangsleistung (D2) und die schwarze Kurve über die transmittierte Leistung (D1). Zur Auswertung wurden die Datenpunkte der Plateaus gemittelt und mit der Belichtungsdauer multipliziert. Überschwinger an den Flanken wurden dabei ausgeschlossen. Das stärkere Rauschen der grauen Kurve erklärt sich durch das drei Größenordnungen schwächere Signal des Rückreflexes am CaF_2 Plättchen. Die lokalen reversiblen Leistungseinbrüche in Größenordnungen von bis zu 30%, wie zum Beispiel bei 3750 s in [Abbildung 3.2](#) sind vermutlich der Temperatur-Instabilität des Kühlsystems zuzuschreiben. Der irreversible Abfall der ursprünglichen Eingangsleistung über die Zeitfenster ganzer Messtage hinweg wird durch die Schädigung der Kristalle im Lasersystem verursacht.

3.2.6. Theoretische Hintergründe

Beer-Lambert-Gesetz Beim Durchlaufen eines optischen Mediums nimmt die eingestrahlte Lichtintensität I aufgrund von Absorption exponentiell mit der Pfadlänge der Lichts z durch das Medium ab [ZZ09]. In der Intensität I wird die Strahlungsleistung P auf die durchleuchtete Fläche bezogen. Letztere wird im Rahmen der Versuche nicht verändert und daher als konstant angenommen. Aufgrund dessen werden im Folgenden ausschließlich die Leistungen betrachtet. Die Transmission T beschreibt die optische Durchlässigkeit des Mediums.

$$T = \frac{P(z)}{P(0)} = e^{-az} \quad (3.2)$$

Die materialabhängige Konstante a wird als *Absorptionskoeffizient* bezeichnet. Sie ist abhängig von der Konzentration c des untersuchten Mediums. In der Chemie wird häufig die logarithmische Darstellung der Transmission zur Basis 10 verwendet. Der negative dekadische Logarithmus der Transmission wird als *Absorption (bzw. Absorbanz)* A bezeichnet.

$$A = -\log(T) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (3.3)$$

Gleichung (3.3) ist auch als *Beer-Lambert-Gesetz* bekannt [Lam60, Bee52]. Dabei stecken die Materialeigenschaften in der Konstante ϵ , welche nicht mehr von der Konzentration abhängt. Die übliche Bezeichnung für ϵ ist *molarer dekadischer Extinktionskoeffizient* in den Einheiten [$L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]. Aus Konventionsgründen wird für ϵ im Folgenden nur noch die Bezeichnung *Extinktionskoeffizient* verwendet. Der lineare Zusammenhang zwischen Absorptions- und Extinktionskoeffizient wird in (3.16) in Abschnitt 3.3.2 explizit aufgeführt. Die Konzentration der absorbierenden Moleküle c in [mol / L] tritt explizit auf. d symbolisiert die Schichtdicke des Mediums und wird üblicherweise in der Einheit [cm] angegeben. A ist einheitenlos und wird in der Regel *optische Dichte (OD)* genannt.

Quantenausbeute Ein Maß für die Effizienz photochemischer Reaktionen ist die Quantenausbeute ϕ . Sie gibt das Verhältnis aus der Anzahl der umgesetzten Moleküle N_{product} und der Anzahl von der Probe absorbierten Photonen $N_{\text{abs.photons}}$ [WH00].

$$\phi = \frac{N_{\text{product}}}{N_{\text{abs.photons}}} \quad (3.4)$$

Wie die Quantenausbeute experimentell bestimmt wurde, wird im Folgenden beschrieben. Zunächst soll dazu die Bestimmung der Anzahl der absorbierten Photonen $N_{abs.photons}$ im Nenner von (3.4) aufgezeigt werden.

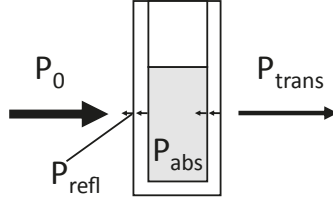


Abbildung 3.3.: Aufspaltung der Licht-Eingangsleistung an der Probenküvette in reflektierte, transmittierte und absorbierte Leistung (schematische Darstellung).

Beim Durchlaufen der Probenküvette, wie in [Abbildung 3.3](#) schematisch dargestellt, spaltet sich die Leistung des eingestrahlichten Lichts P_0 in verschiedene Anteile auf: Absorbierte Leistung P_{abs} , reflektierte Leistung P_{refl} und transmittierte Leistung P_{trans} .

$$P_0 = P_{refl} + P_{abs} + P_{trans} \quad (3.5)$$

Die für die Bestimmung der Quantenausbeute relevante Größe ist die von der Probe absorbierte Leistung. Diese bildet den Hauptanteil der absorbierten Leistung neben einem viel geringeren Anteil, welcher vom Lösungsmittel absorbiert wird. Experimentell wurde die absorbierte Leistung bestimmt aus der Eingangsleistung ohne die Küvette und der transmittierten Leistung durch die Probe. Leistungsverluste durch die Küvette und das Lösungsmittel selbst wurden für die eingesetzte Belichtungswellenlänge von 290 nm mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Küvette zu ca. 10% bestimmt. Dies steht in Einklang mit den nach Fresnel errechneten Reflexionsverlusten an den Quarzglas-Küvettenfenstern von etwa 8% für 290 nm und 266 nm [[ZZ09](#), [18a](#), [18e](#)]. Unter Berücksichtigung dieser Korrektur und durch Multiplikation mit der Belichtungsdauer t_{illu} , ergab sich die absorbierte Strahlungsdosis E_{abs} zu:

$$E_{abs} \approx (0.9 \cdot P_0 - P_{trans}) \cdot t_{illu} \quad (3.6)$$

Division durch die Energie eines einzelnen Photons $E_{photon}|_{290nm}$ von 4.28 eV bei der Belichtungswellenlänge von 290 nm [[Stö07](#)], liefert die Gesamtzahl der absorbierten Photonen $N_{abs.photons}$ im Nenner der Quantenausbeute (3.4).

Die Ermittlung der Anzahl während der Belichtung umgesetzter Moleküle im Zähler, hängt von der Detektion des jeweiligen Experimentes ab. In diesem Abschnitt soll ausschließlich auf die spektralphotometrische Detektion eingegangen werden. Eine weitere Form der Detektion und die zugehörige Bestimmung der Quantenausbeute werden in [Unterabschnitt 4.3.2](#) vorgestellt.

Grundlage für die Bestimmung von $N_{product}$ ist die Absorptionsänderung der Probe aufgrund der Belichtung. Die Umwandlung von T(CPD)T in intaktes TT ist spektral durch eine Zunahme der Absorption im TT Maximum bei 266 nm zu beobachten (vgl. [Abbildung 1.2](#)). Wie die Höhe der Signalzunahme mit der umgesetzten Stoffmenge zusammenhängt, soll durch folgende Rechnung veranschaulicht werden:

Vor der Belichtung seien N_{CPD}^0 Teilchen in der Probe enthalten. Die Belichtung wandelt geschädigtes T=T in intaktes TT mit einer Konversion γ um. Dann liegen nach der Belichtung $\gamma \cdot N_{CPD}^0$ reparierte Teilchen und $(1 - \gamma) \cdot N_{CPD}^0$ geschädigte Teilchen vor. Die Absorbanz der Probe bei 266 nm ist vor der Belichtung $A^0|_{266nm}$ und nach der Belichtung $A^{illu}|_{266nm}$.

$$A^0|_{266nm} = \frac{d}{V \cdot N_A} \cdot N_{CPD}^0 \cdot \epsilon_{T=T}|_{266nm} \quad (3.7)$$

$$A^{illu}|_{266nm} = \frac{d}{V \cdot N_A} \cdot N_{CPD}^0 \cdot [(1 - \gamma) \cdot \epsilon_{T=T} + \gamma \cdot \epsilon_{TT}]|_{266nm} \quad (3.8)$$

$$\Delta A|_{266nm} = [A^{illu} - A^0]|_{266nm} = \frac{d \cdot \gamma}{V \cdot N_A} \cdot N_{CPD}^0 \cdot [\epsilon_{TT} - \epsilon_{T=T}]|_{266nm} \quad (3.9)$$

$$N_{product} = \gamma \cdot N_{CPD}^0 = \frac{\Delta A|_{266nm} \cdot V \cdot N_A}{d \cdot [\epsilon_{TT} - \epsilon_{T=T}]|_{266nm}} \quad (3.10)$$

Die Absorptionsänderung aufgrund der Belichtung spiegelt sich in der Differenz $\Delta A|_{266nm}$ (3.9) wider. Auflösen nach der Anzahl umgesetzter Teilchen ergibt (3.10) für $N_{product}$, welches direkt in (3.4) eingesetzt werden kann.

$$\phi = \frac{V \cdot N_A \cdot E_{photon}|_{290nm}}{d \cdot [\epsilon_{TT} - \epsilon_{T=T}]|_{266nm}} \cdot \frac{\Delta A|_{266nm}}{E_{abs}|_{290nm}} \quad (3.11)$$

$$\phi \approx 1.77 \cdot 10^{-2} \frac{J}{OD} \cdot \frac{\Delta A|_{266nm}[OD]}{E_{abs}|_{290nm}[J]} \quad (3.12)$$

Erforderlich für die Berechnung sind Kenntnisse über die Extinktionskoeffizienten von Produkt ϵ_{TT} und Edukt $\epsilon_{T=T}$ bei der Beobachtungswellenlänge von 266 nm. In der Literatur finden sich Werte von $294 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das T=T-Dimer und

18944 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das intakte TT [Pan12]. Das belichtete Probenvolumen betrug 800 μl , die Küvettendicke 1 cm. N_A repräsentiert die Avogadro-Konstante mit $6.022 \cdot 10^{23}$ [Stö07].

In (3.12) wurden die oben genannten Zahlenwerte für die Bildung bzw. Reparatur eines T(CPD)T Schadens im Dinukleotid eingesetzt. Im Folgenden werden dieselben Extinktionskoeffizienten für T(CPD)T Schäden an kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden verwendet. Sekundärreaktionen werden dadurch nicht berücksichtigt. Die Stoffmenge der Probe und der Quotient aus Absorptionsänderung und absorbierte Dosis wird im Rahmen dieser Arbeit aus experimentellen Daten gewonnen. Die daraus resultierenden Quantenausbeuten liefern direkte Hinweise auf die Effizienz der jeweiligen Photoreaktionen und werden in Abschnitt 3.3 gegenübergestellt.

Berechnung der absorbierten Leistung aus der Belichtungsleistung Im Rahmen der Belichtungsexperimente wurde die transmittierte Leistung zwischen verschiedenen Messtagen zum Teil mit unterschiedlichen thermischen Detektoren gemessen (D1 in Abbildung 3.1). Der Vergleich der zugehörigen Daten gibt Grund zu der Annahme, dass die Genauigkeit der eingesetzten Detektoren unterschiedlich war. Dieser Unterschied fällt insbesondere bei optischen dünnen Proben, wie den untersuchten Tetramer-Proben, ins Gewicht. In diesen Fällen wurde die absorbierte Dosis aus der Eingangsleistung und der spektroskopisch bestimmten Absorbanz bei 290 nm (3.13) berechnet.

$$E_{abs} \approx 0.9 \cdot P_0 \cdot (1 - 10^{-A[290nm]}) \cdot t_{illu} \quad (3.13)$$

3.2.7. Schmelzkurven

Ein Teil der Belichtungsmessungen wurde an doppelsträngigen Sequenzen durchgeführt. Dazu wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 6 Basen mit ihrem Komplementärstrang über HEGL zu einer Haarnadel-Struktur verbunden. Bei Raumtemperatur können die Basen Wasserstoffbrücken-Bindungen (Watson-Crick-Basenpaarungen) zu ihren komplementären Basen ausbilden. Wird die Temperatur langsam erhöht, öffnen sich immer mehr Basenpaarungen und das Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung der einzelsträngigen Konformation. Bei hohen Temperaturen knapp unter 90°C liegen nahezu alle Moleküle einzelsträngig vor. Beim Abkühlvorgang können sich erneut Wasserstoffbrücken bilden. Die Geschwindigkeit des Abkühlungsprozesses bestimmt die Gleichmäßigkeit der Watson-Crick-Basenpaare. Je langsamer der Abkühlprozess, umso mehr Zeit haben die Moleküle im lokalen thermischen Gleichgewicht, die stabilste Konformation zu bilden, welche der natürlichen Doppelstrangstruktur entsprechen. Den langsamen Abkühlvorgang einzelsträngiger DNA zur definierten Bildung von Doppelsträngen bezeichnet man als *Annealing*. Solch ein Vorgang wurde bei allen HEGL-Proben unmittelbar vor der Messung durchgeführt.

Hierzu wurden die Proben in einem Wasserbad mit einem Volumen von ca. 3 Litern auf ca. 85°C aufgeheizt. Anschließend kühlten die Proben im Wasserbad über einen Zeitraum von etwa 4 Stunden langsam auf Raumtemperatur ab und nahmen dabei zunehmend doppelsträngige Konformation ein.

Zwischen vorwiegend einzelsträngiger Konformation bei hohen Temperaturen und vorwiegend doppelsträngiger DNA bei niedrigeren Temperaturen gibt es einen Temperaturwert, bei dem die Hälfte der Moleküle einzel- und die andere Hälfte doppelsträngig vorliegt. Diese Temperatur wird als *Schmelzpunkt* doppelsträngiger DNA bezeichnet. Eine Bestimmung des Schmelzpunkts im Vorfeld zu Messungen an doppelsträngigen Proben ist sinnvoll um sicherzustellen, dass sich die Mehrheit der Moleküle unter Laborbedingungen in der gewünschten doppelsträngigen Konformation befindet. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wird eine spektroskopische Eigenschaft doppelsträngiger DNA genutzt, welche als *Hypochromie* bezeichnet wird [BBU15b]: In doppelsträngiger Konformation absorbieren die Moleküle weniger Licht als einzelsträngig. Eine Überwachung der Absorbanz bei 260 nm während eines gleichmäßigen Aufheizvorgangs bis knapp unter 90°C gibt Auskunft über die Verschiebung des Gleichgewichtes. Der Wendepunkt im Temperaturverlauf zwischen der niedrigen Absorbanz der doppelsträngigen und der hohen Absorbanz der einzelsträngigen Konformation entspricht der Schmelztemperatur. Diese kann mit Hilfe einer linearen Anpassung ermittelt werden. Schmelzkurven der verwendeten Proben wurden mit einem automatisierten *qChanger* Messeinsatz (*Mountain Photonics*) zum *Shimadzu UV 1800* Spektralphotometer und der zugehörigen Software aufgezeichnet. Beim *qChanger* handelte es sich um einen in das Spektralphotometer einsetzbaren temperierbaren Küvettenwechsler, welcher die Proben während der Messung mit Hilfe von Magnetrührern durchmischte. Eine weitere Küvette derselben Probe bei gleicher Konzentration mit einer Temperatur von 24°C erlaubte die Referenzierung auf Labortemperatur. Hierzu wurde der Küvettenhalter im Referenzstrahlengang des Spektralphotometers mit einem selbst entwickelten Durchfluss-System ergänzt und in den Temperatur-Regelkreis eingebaut. Da sich die vorgenommenen Maßnahmen ausschließlich auf eine Erweiterung des Kühlsystems beziehen, wird an dieser Stelle auf eine separate Abbildung verzichtet.

3.2.8. TRIR Spektroskopie

Wahl des Lösungsmittels Im Gegensatz zu den stationären Messungen ist die Verwendung von H_2O als Lösungsmittel für die IR-Spektroskopie ungeeignet. Die Ursache hierfür liegt in einer starken Biege-Schwingung des Moleküls bei ca. 1640 cm^{-1} [Lib94], welche die charakteristischen Signaturen der DNA-Moleküle überlagert. Abhilfe schafft die Verwendung von deuteriertem Wasser (D_2O). Bei diesem Wasser-Isotop ist die genannte Biegeschwingungs-Bande zu kleineren Wellenzahlen von etwa 1210 cm^{-1} verschoben, wodurch der Spektralbereich zwischen 1300 cm^{-1} und 2000 cm^{-1} experimentell zugänglich wird [Sch08].

Wie in [Unterabschnitt 3.2.4](#) wurden die Proben in 50 mM Phosphatpuffer gemessen. Als Lösungsmittel diente Deuterium Oxid der Reinheit 99.9% (151882, *Sigma-Aldrich*). Die Konzentration der Proben wurde gegenüber den stationären Messungen um etwa einen Faktor 100 auf 10 mM / Base erhöht. Diese ist erforderlich für den Einsatz einer Durchfluss-Küvette der Schichtdicke 90 μm zum hinreichend schnellen Austausch des angeregten Probenvolumens.

Aufbau Alle im Zuge der zeitaufgelösten Infrarot (Time Resolved Infrared, TRIR) Spektroskopie verwendeten Messapparaturen wurden bereits in Vorgängerarbeiten detailliert beschrieben [Sch08, Bla11] und werden daher nur kurz eingeführt. Das Prinzip des Anrege-Abtast-Aufbaus ist in [Abbildung 3.4](#) dargestellt. Als Lichtquelle dient ein Ti:Sa basiertes fs-gepulstes Laser-System (*Libra Coherent*), welches etwa 130 fs lange Lichtimpulse der Wellenlänge 800 nm mit einer Repetitionsrate von 1 kHz emittiert. Das Licht wird in Anrege- und Abtast-Zweig aufgeteilt. Frequenzkonversionsprozesse in beiden Zweigen erlauben eine Anregung der Probe bei 266 nm und ein Abtasten im Mittelinfrarotbereich. Das Licht beider Zweige wird am Probenort räumlich und zeitlich überlagert. Ein Unterbrecherrad (Chopper, 500 Hz) im Anrege-Zweig ermöglicht das abwechselnde Abtasten eines angeregten gegen ein nicht angeregtes Probenvolumen. Die zugehörigen Absorptionsänderungen im Mittelinfraroten werden nach Durchlauf eines *Chromex* Gitterspektrographs mittels eines 64-Kanal MCT Detektors aufgenommen (*InfraRed Associates Inc.*). Der Detektor verfügt über zwei Zeilen, von denen die zweite Zeile der Referenzierung dient. Zur Aufzeichnung transienter Spektren wird die zeitliche Verzögerung des Anrege-Impulses gegen den Abtast-Impuls mit Hilfe eines mechanischen Schlittens gezielt verändert. Die Polarisationsrichtung des Anregungslichtes ist mit Hilfe einer Kombination aus einer $\lambda/2$ -Wellenplatte und einem Polarisator um -54.7° gegenüber der des Abtastlichtes gedreht, um Messartefakte aufgrund von Reorientierungs-Dynamiken zu vermeiden („magischer Winkel“, FMR76).

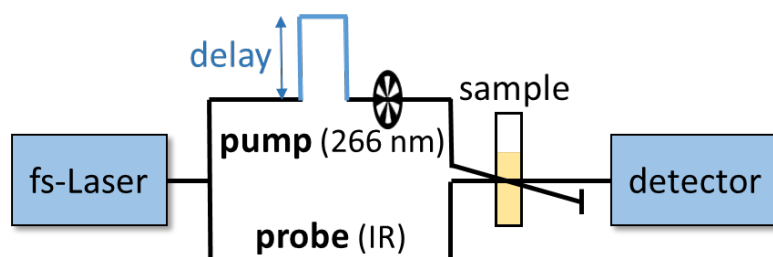


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung des Anrege-Abtast-Aufbaus.

Die Frequenzkonversion im Anrege-Zweig von 800 nm zu 266 nm ist in [Abbildung 3.5](#) schematisch dargestellt. Der Aufbau folgt [Sch08]. Hierbei wird 800 nm Licht in einem ersten BBO Typ 1 Kristall frequenzverdoppelt. Die Polarisationsrich-

tung der zweiten Harmonischen ist gegenüber der Fundamentalen um 90° gedreht. Ein α -BBO gleicht Laufzeitunterschiede beider Komponenten aus und eine Zwei-Wellenlängen-Verzögerungsplatte (TWR) rotiert die Polarisationsrichtung der zweiten Harmonischen Oszillation um 90° gegenüber der Fundamental, sodass Fundamentale und zweite Harmonische Oszillation mit derselben Polarisationsrichtung auf einen zweiten BBO Typ 1 treffen. Hier erfolgt die Summenfrequenz-Erzeugung zur dritten Harmonischen mit der Wellenlänge 266 nm.

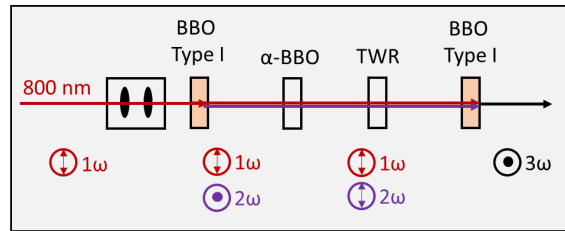


Abbildung 3.5.: Anrege-Zweig des Aufbaus [Abbildung 3.4](#) zur Erzeugung der dritten Harmonischen mit zugehörigen Polarisationsrichtungen (nach [Sch08](#)). TWR: Zwei-Wellenlängen-Verzögerungsplatte, BBO: β -Barium-Borat.

Das Abtastlicht wird in einer Kaskade von optisch parametrischen Verstärkern (OPA) erzeugt [Abbildung 3.6](#). Aus Licht der Wellenlänge 800 nm wird zunächst in einem YAG-Kristall ein Superkontinuum erzeugt (SCG). Dieses wird in einem ersten BBO Typ 2 Kristall mit 800 nm Licht räumlich und zeitlich überlagert, wodurch Licht bei einer Zentralwellenlänge von etwa 1400 nm verstärkt wird. Ein weiterer Teil des ursprünglichen 800 nm Lichtes wird in einem ähnlichen Prozess in einem zweiten BBO Typ 2 Kristall mit dem zuvor erzeugten 1400 nm Licht räumlich und zeitlich überlappt. Dadurch entsteht Strahlung mit den Zentralwellenlängen 1400 nm und 1800 nm, woraus in einem $AgGaS_2$ Kristall Strahlung der Wellenlänge 3 bis 7 μm durch Differenzfrequenzerzeugung (DFM) entsteht. Die spektrale Breite der Impulse beträgt etwa 200 cm^{-1} [[Bla11](#)]. Aufgrund der kurzen Impulslänge kann es verstärkt zu Zwei-Photonen-Ionisation der Probenmoleküle kommen [[Sch08](#)]. Zur Reduktion dadurch hervorgerufener Artefakte wurden die Anrege-Impulse zeitlich durch einen zusätzlichen 25 cm langen Quarzglas-Block gestreckt.

Die Feineinstellung des zeitlichen Überlapps beider Impulse wird durch piezosteuerte Retroreflektoren erreicht. Zur Justage des Mittelinfrarot-Strahlenganges wurde als Hilfsmittel ein HeNe-Laser eingesetzt. Dieser wurde ausschließlich während der Justage vor dem $AgGaS_2$ Kristall in die DFM-Stufe eingekoppelt und bis zur Detektion verfolgt. Die Feineinstellung des räumlichen Überlapps am Probenort erfolgte mit Hilfe eines dünnen Germanium-Plättchens.

Die Probenkammer wurde zur Reduktion von Wasserdampfbanden während der Messung mit Trockenluft gespült. Das Probenvolumen wurde während der Messung in einer selbstgebauten Durchflussküvette (angelehnt an [Sch08](#) Abb. 3.7) ausgetauscht.

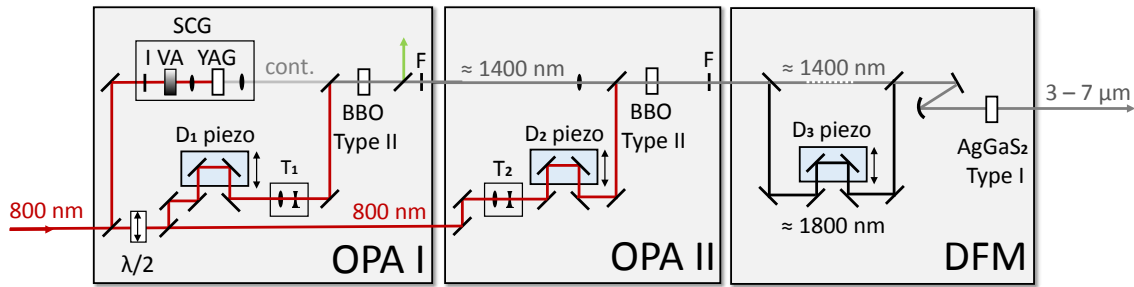


Abbildung 3.6.: Abtast-Zweig des Aufbaus [Abbildung 3.4](#): Kaskade optisch parametrischer Prozesse zur Erzeugung der Mittelinfrarot Abtast-Impulse aus 800 nm Licht (nach [Bla11](#)). SCG: Weißlicht-Erzeugung, I: Irisblende, VA: Variabler Abschwächer, YAG: Yttrium-Aluminium-Granat, D: Verzögerungsstrecke, T: Teleskop, AgGaS₂: Silberthiogalat, F: Filter.

Hierzu wurde eine PTFE-Schlauchpumpe (*Masterflex 77390-00 MCP, Cole Parmer*) verwendet. Als Fenstermaterialien wurden beschichtete BaF₂-Fenster der Dicke 3 mm eingesetzt. BaF₂ wurde aufgrund hoher Transmission im UV und IR-Bereich verwendet. Aufgrund seiner Wasserlöslichkeit wurden die Kontaktflächen zur Probe beschichtet. Zwischen den Fensterplättchen wurde ein PTFE-Abstandhalter mit einer Dicke von etwa 90 μm eingesetzt. Ein schmaler Ausschnitt mit einer Breite von ca. 2 mm im Abstandhalter bildete den Probendurchlaufkanal für die Messungen. Bohrungen in einem der beiden BaF₂ Fenster am Ende des Kanals ermöglichen den Zu- und Ablauf der Probenlösung. PTFE-Verbindungsstücke wurden mit Gummidichtungen abgedichtet. Eine Pumpgeschwindigkeit von 45 rpm (Umdrehungen pro Minute, entspricht ca. 0.05 mL/s, vgl. [Sch14](#)) sorgte für vollständigen Austausch des Probenvolumens zwischen zwei aufeinanderfolgenden Lichtimpulsen. Der Durchmesser des Anrege-Flecks am Probenort betrug etwa 150 μm. Für eine detaillierte Beschreibung des kompletten Messablaufes, sowie der anschließenden Datenauswertung mit Anpassungsprozedur sei auf [[Sch08](#), [Pil16](#)] verwiesen.

Wellenlängen-Korrektur Der verwendete Gitterspektrograph (*Chromex*) verfügt über 3 wechselbare Gitter für verschiedene Wellenlängenbereiche mit unterschiedlicher Auflösung. In den Messungen wurde das Gitter mit 75 Linien / mm (Blaze für 8 μm) bei einer Spaltbreite von 2000 μm verwendet. Die niedrigere spektrale Auflösung ermöglichte im Gegenzug die gleichzeitige Abbildung des gesamten Spektralbereiches von etwa 1500 bis 1700 cm⁻¹. Eine Herausforderung stellte die falsche Kalibrierung des Gitters seitens des Herstellers dar. Das Hauptmaximum befand sich bei neutraler Geräteeinstellung auf der ersten Ordnung der HeNe-Laser Linie von 632.8 nm. Dies wurde zunächst manuell in den Geräteeinstellungen durch einen Versatz des Gitters korrigiert. Zur Feinkorrektur wurde eine Messung mit Hilfe des breitbandigen Infrarot-Lichts aus dem Abtast-Zweig durchgeführt. Bei geöffneter Probenkammer verursacht der eintretende Wasserdampf Einbrüche im detektierten

Abtast-Spektrum bei charakteristischen Bandenpositionen ([Abbildung 3.7](#)). Diese Banden wurden ausgewertet und mit der Literatur verglichen (graue Kurve) [Rot05]. Die Abweichungen von den Literaturwerten wurden linear angepasst und nachträglich als Korrektur auf die gemessenen Spektren angewandt (schwarze Kurve). Leichte Abweichungen der Banden-Positionen können auf die gröbere Auflösung des Gitters zurückzuführen sein.

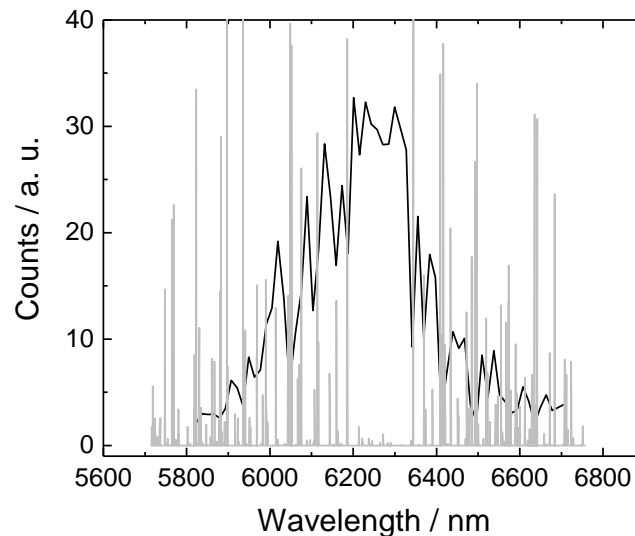


Abbildung 3.7.: Wellenlängen korrigiertes IR-Spektrum aus dem Abtast-Zweig bei geöffneter Probenkammer (schwarz) im Vergleich zu einem Referenz-Wasserdampf-Spektrum nach [Rot05] (hellgrau).

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Auswertung der stationären Differenzspektren

Im Folgenden soll die Auswertung der stationären Belichtungsexperimente an Proben, welche einen T(CPD)T Schaden enthalten, exemplarisch an den Ergebnissen der Probe GAT=T aufgezeigt werden.

Durch die Belichtung bei 290 nm wurden die Oligonukleotide selektiv an ihren intakten Basen angeregt ([Abbildung 3.8 A](#)). Hier im Beispiel wird der größte Anteil des Lichts von G absorbiert. Der Anteil des Lichts, welcher vom T=T absorbiert wird und somit eine direkte Reparatur des T(CPD)T Schadens [HIR07] hervorrufen könnte, ist im Vergleich dazu gering. Zu Beginn der Belichtung liegt in der Probe zu nahezu 100% T(CPD)T geschädigtes GAT=T vor. Durch UV-induzierte Reparatur-effekte entsteht während der Belichtung nach und nach GATT. Die Umwandlung

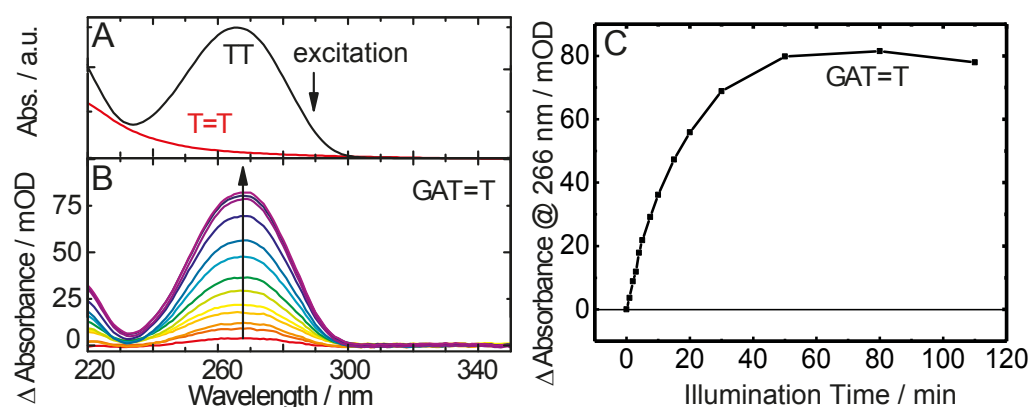


Abbildung 3.8.: A: UV-Absorptionsspektren von intaktem TT im Vergleich zu T=T. B: Differenzspektren von GAT=T nach Belichtung bei 290 nm. C: Absorptionsänderung von GAT=T bei 266 nm nach Belichtung bei 290 nm gegen die Belichtungszeit (nach [Buc16](#)).

von T(CPD)T in intaktes TT kann aufgrund ihrer unterschiedlichen Absorptionsspektren (vgl. [Abbildung 3.8 A](#)) in den Differenzspektren als allmählicher Anstieg der TT Bande mit einem Maximum bei 266 nm beobachtet werden ([Abbildung 3.8 B](#)). Die Rückgewinnung der intakten GATT Sequenz wurde anhand der maximalen Absorptionsänderungen bei 266 nm quantifiziert. Hierzu wurden die mit dem Pfeil in [Abbildung 3.8 B](#) gekennzeichneten Maxima-Datenpunkte zunächst gegen die Belichtungsdauer aufgetragen ([Abbildung 3.8 C](#)). Diese wurde im weiteren Verlauf nach (3.6) mit den Leistungsdaten in die zugehörige Dosis umgerechnet. Die positive Steigung der Kurve in [Abbildung 3.8 C](#) bei kleinen Belichtungszeiten weist auf eine Reparatur hin. Diese wird im Verlauf der Belichtung schwächer und erreicht nach ca. 80 min einen Nulldurchgang. Hintergrund für dieses Verhalten ist die Tatsache, dass die Differenzspektren Hinweise auf das jeweils vorherrschende chemische Gleichgewicht liefern. Es können jeweils nur die Netto-Einflüsse unterschiedlicher gleichzeitig ablaufender chemischer Reaktionen beobachtet werden. Zu Beginn liegen alle Moleküle mit T(CPD)T Schaden vor. Durch die Belichtung werden Moleküle repariert. Im weiteren Verlauf der Belichtung können bereits reparierte Moleküle ihrerseits jedoch wieder geschädigt werden. So hat die beschriebene Reparatur beispielsweise eine Rückreaktion von intaktem TT zu geschädigtem T=T mit einer Quantenausbeute von ca. 1% [[LR93](#)]. Es kann jedoch auch zur Bildung irreversibler Folgeprodukte kommen. Die Schädigung ist implizit in Form einer Abnahme der Reparatur an der TT-Bande zu verzeichnen. Schwerpunkt dieser Arbeit sind die Primärprozesse. Aus diesem Grund werden die weiteren Betrachtungen auf den Anfangsbereich bei niedrigen Belichtungs Dosen eingeschränkt.

Einige Differenzspektren von Oligonukleotiden mit und ohne anfängliche T(CPD)T Schäden sind exemplarisch in [Abbildung 3.9](#) gegenübergestellt. Das Verhalten von

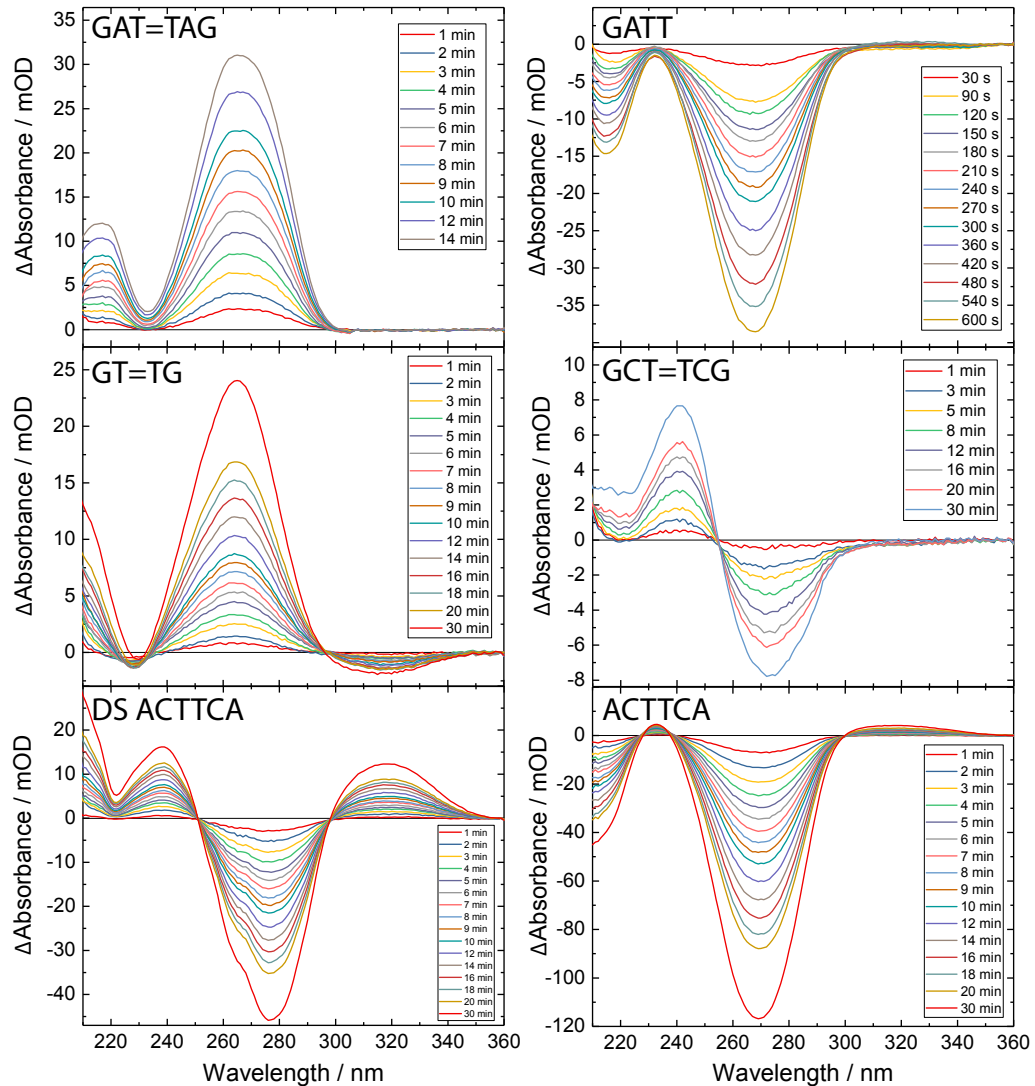


Abbildung 3.9.: Differenzspektren exemplarischer Oligonukleotide mit und ohne T(CPD)T Schaden nach UV-Belichtung bei 290 nm. Korrekturen: Mittelung über zwei Spektren je Belichtungsstufe, Abzug der unbelichteten Spektren und des Untergrunds bei rund 360 nm.

GAT=TAG ist dem von GAT=T sehr ähnlich. Das Hauptmaximum bei einer Wellenlänge von 266 nm weist deutlich auf die belichtungsinduzierte T(CPD)T Reparatur hin. Im Wellenlängenbereich von 320 nm, dem Bandenbereich des T(6-4)T Schadens, tritt keine Veränderung auf. Daraus ist zu schließen, dass bei geringen Belichtungs-dosen die T(CPD)T-Reparatur im Vordergrund steht. Die Differenzspektren von AGT=TGA, T=TAG, GAAT=TAAG, AAT=TAA und GGT=TGG zeigen in den beiden genannten Punkten das gleiche Verhalten und werden daher nicht mehr separat aufgeführt. Auf die individuell unterschiedlichen Höhen der Maxima bei

266 nm wird in [Unterabschnitt 3.3.2](#) eingegangen. Die hochfrequenten Banden bei Wellenlängen unter 250 nm sind eine Überlagerung der Absorptionsänderungen aller beteiligten Nukleotide (vgl. [Abbildung 1.2](#)) und können nicht eindeutig separiert werden. Auf diese wird daher im Folgenden nicht weiter eingegangen.

Der Reparatur von GAT=TAG steht die Schädigung von GATT gegenüber, welche sich nahezu invers verhält. Bei 100% intakter GATT Sequenz als Ausgangspunkt steht bei UV-Belichtung die Bildung des T(CPD)T Schadens im Vordergrund, was sich in einer stark ausgeprägten Signalabnahme bei 266 nm äußert. In der Auftragung der Absorbanz-Änderung bei 266 nm (wie [Abbildung 3.8 C](#)) äußert sich dies in einer negativen Steigung des Graphen. Im Gegensatz zu GAT=TAG ist bei GATT ein leichter Anstieg der T(6-4)T Bande bei 320 nm zu verzeichnen. Dies steht in Einklang mit der zwei Größenordnungen schwächeren Quantenausbeute des T(6-4)T Schadens im Vergleich zum CPD beim TT Dinukleotid [[LR93](#)].

Das Reparaturverhalten von GT=TG ist dem von GAT=TAG ähnlich mit einem wesentlichen Unterschied: die rückläufige Bande bei 318 nm. Diese kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist das Verschwinden eines T(6-4)T Schadens (Spektrum vgl. [SGZ15](#)). Die Reaktion vom intakten TT Dinukleotid zum T(6-4)T Schaden ist unter UV-Belichtung nicht reversibel [[LR93](#)]. Eine Abnahme wäre daher nur durch eine Weiterreaktion des T(6-4)T Schadens zu erklären. Dass die Bande mit dem Beginn der Belichtung niedriger wird, könnte darauf hindeuten, dass in der unbelichteten Probe bereits ein gewisser Anteil an T(6-4)T geschädigter Probe enthalten war. Dies würde die Messung wie folgt beeinflussen: Der T(6-4)T Schaden absorbiert bei der Anregungswellenlänge von 290 nm wesentlich stärker als der T(CPD)T Schaden [[SGZ15](#)]. Daher würde ein Teil der Anregungsenergie entweder direkt vom T(6-4)T Schaden oder von seinen benachbarten Basen absorbiert und zu einer Folgereaktion führen. Die Reparatur des T(CPD)T Schadens würde von diesem Prozess nicht beeinträchtigt. Die von den T(CPD)T geschädigten Oligomeren absorbierte Leistung würde dadurch überschätzt und müsste in den Δ Absorbanz Graphen nach unten korrigiert werden. Dies hätte eine höhere Steigung der GT=TG Kurve zur Folge.

Dagegen spricht jedoch die HPLC-Analyse ([Unterabschnitt 3.3.4](#), [Abbildung 3.19](#)), welche auf eine reine Probe hindeutet. Fehler könnten hier durch sehr ähnliches Adsorptionsverhalten am Säulenmaterial entstehen. Eine weitere Ursache könnte in der räumlichen Anordnung der Moleküle zueinander liegen. Guanin reiche Sequenzen sind in der Lage, Hoogsten-Basenpaarungen auszubilden und Sekundärstrukturen wie beispielsweise Quadruplexe zu formen [[Ban17](#)]. In Kombination mit der räumlichen Struktur des T(CPD)T Schadens [[Lee04](#)] könnte dies dazu führen, dass sich aus den GT=TG Molekülen Sekundärstrukturen formen, welche sich aufgrund der Reparatur wieder öffnen. Eine detailliertere Diskussion dieses Effektes findet sich in [Abschnitt 3.4](#). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die genauen Ursachen für die Beobachtung nicht aufgeklärt werden. Es sind daher höhere Fehler in der Steigung und Quantenausbeute der GT=TG Probe anzunehmen.

Die Sequenz GCT=TCG zeigt eine Netto-Schädigung. Ein derartiger Effekt könnte beispielsweise als Sekundärreaktion nach erfolgter Reparatur zu Stande kommen. Jedes reparierte GCTTCG Molekül bietet 3 mögliche Stellen für neue CPD Bildung an: CT, TT und TC. Dies würde für eine starke Netto-Schädigung sprechen. Lässt man Sekundärreaktionen außer Acht, spricht ein Rückgang der Absorption bei 273 nm für eine direkte Schädigung am C, welches sein Absorptionsmaximum bei 271 nm hat ([Abbildung 1.2](#)). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit zur Bildung eines C(4-8)G bzw. G(4-8)C Photoprodukts mit einem Absorptionsmaximum bei 275 nm [[Mün11](#)]. Für eine direkte Schädigung sprechen die schwachen Belichtungs Dosen und die Lage des Minimums.

Die intakte doppelsträngige Sequenz DS ACTTCA wird stark geschädigt. Das lokale Minimum liegt bei 276 nm mit einer Schulter bei 266 nm. Die Banden geben Hinweise auf die Schädigung von C und T. Das stark ausgeprägte Maximum bei 320 nm signalisiert eine deutliche Zunahme des T(6-4)T Schadens.

Die leichte Rotverschiebung und die Schulter könnte mit der doppelsträngigen Struktur zusammenhängen. Hinweise darauf liefert der Vergleich mit der einzelsträngigen Sequenz ACTTCA. Der komplementäre Gegenstrang TGAAGT ist aufgrund seiner Sequenz sehr photostabil. Der Hauptbeitrag zur Schädigung kommt daher vom ACTTCA durch die vier benachbarten Pyrimidine [[CGD14](#)]. Es ist ein leichter Anstieg der T(6-4)T Bande zu verzeichnen. Die sehr starke Abnahme bei 269 nm ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bildung der verschiedenen CPD Schäden zurückzuführen.

Proben Chargen Vor der eigenen Herstellung der Proben durch Sensitizing mit Aceton (vgl. [Unterabschnitt 3.2.3](#)) wurden die Proben kommerziell erworben (*iba Lifesciences*). Hierfür wurden vom Hersteller synthetische Cis-Syn T(CPD)T Bausteine in kanonische DNA-Oligonukleotide eingebaut. Dieser Vorgang ist aufgrund der räumlichen Struktur des T(CPD)T Schadens technisch aufwendig und hat eine geringe Ausbeute. Es kann daher möglicherweise zu unvollständigen oder Fehlkopplungen der DNA-Bausteine kommen, was sich in Verunreinigungen der Probe äußert. In eigenen massenspektroskopischen Untersuchungen wurde in mehreren kommerziellen Proben die Massen der intakten Oligonukleotide ohne den T(CPD)T Baustein nachgewiesen. Zum Beispiel wurde in der Probe GAT=TAG auch die Masse von GAAG gefunden. Es ist daher anzunehmen, dass die Nebenfraktionen bei 290 nm in vergleichbarer Weise absorbiert, wie die gewünschten Moleküle. Die von den T(CPD)T geschädigten Molekülen absorbierte Dosis wird somit überschätzt. Eine Korrektur der absorbierten Dosis um den Anteil der HPLC-Nebenfraktion reduziert den Fehler. [Abbildung 3.10 A](#) zeigt die Auswirkung der Korrektur für die Probe GAT=TAG. Die absorbierten Dosen der betroffenen Proben wurden entsprechend korrigiert.

Neben Verunreinigungen besteht aber auch die Möglichkeit, dass aus der Synthese ein anderes Produkt hervorgegangen ist. Dieser Verdacht liegt im Fall der Probe

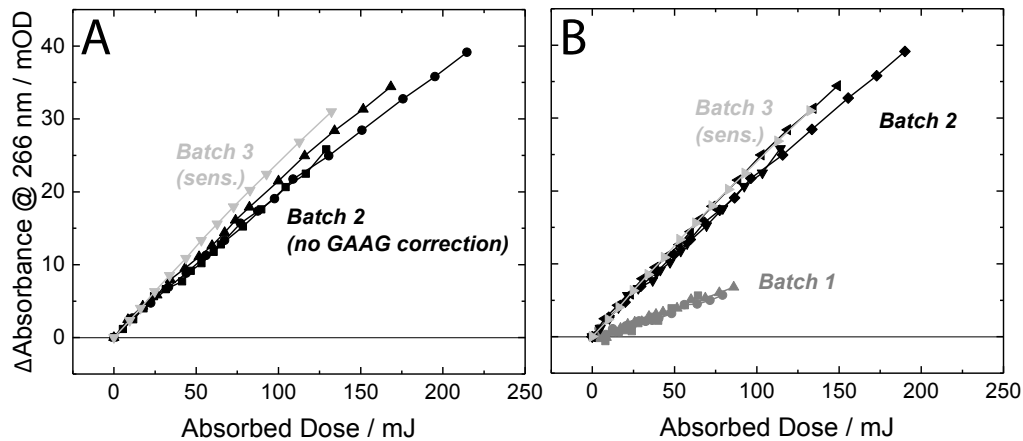


Abbildung 3.10.: Einflüsse der Probenverunreinigung auf die Streuung der Belichtungsergebnisse: Saubere Probe [Sensitizing mit Aceton, [Unterabschnitt 3.2.3](#)] (Batch 3) vs. kommerziell erworbene Proben-Chargen (Batch 1 und 2, *iba Lifesciences*) der Sequenz GAT=TAG mit 10% Verunreinigung mit (A) und ohne (B) Korrektur der absorbierten Dosis.

GAT=TAG vor. In [Abbildung 3.10 B](#) sind die spektroskopischen Messergebnisse von zwei unterschiedlichen kommerziellen Proben gegenüber gestellt (schwarze und dunkelgraue Kurvenschar). Jede der beiden Kurvenscharen zeigt die Ergebnisse von drei Messreihen. Zwischen den beiden Chargen zeigen sich deutliche Unterschiede. Die eigene Herstellung einer weiteren Probe durch Sensitizing mit Aceton unterstreicht die Richtigkeit von Batch 2. Deren Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt. Die Ergebnisse der ersten Probe wurden in [\[Buc16\]](#) verwendet. Es besteht allerdings der Verdacht, dass die Probe synthesebedingt fehlerhaft war. In den Fällen der zweiten GAT=TAG Probe und sämtlicher GAT=T Proben konnten die Eigenschaften der Proben durch den Vergleich mit einer selbst hergestellten Probe auf ihre Richtigkeit bestätigt werden. Bei den doppelsträngigen Proben mit T(CPD)T Schaden war dies nicht möglich. Die zugehörigen Schmelzkurven geben jedoch starke Hinweise auf das Vorhandensein eines T(CPD)T Schadens (vgl. [Unterabschnitt 3.3.3](#)). Von den Sequenzen GCT=TCG und GGT=TGG lag jeweils nur eine Probe vor. Durch die fehlende Vergleichsmöglichkeit können keine Aussagen über die Güte der beiden Proben gemacht werden. Gleiches gilt für die Probe ACT=TCA. Alle weiteren Proben wurden entweder selbst hergestellt, stammen aus anderer Quelle oder verfügen über keinen T(CPD)T Schaden und unterliegen daher mit Sicherheit nicht dem oben beschriebenen Synthese-Artefakt.

Reproduzierbarkeit der Daten Die physikalischen Größen, die in die Bestimmung der Quantenausbeute eingehen, stammen zum Teil aus eigenen Messungen. Die verschiedenen Fehlerbeiträge sollen im Folgenden analysiert werden. Die beiden wichtigsten Messgrößen zur Bestimmung der Quantenausbeute sind die Absorptions-

änderung bei 266 nm und die absorbierte Dosis bei 290 nm.

Differenzspektren stark verdünnter Proben, wie beispielsweise [Abbildung 3.18](#) in [Unterabschnitt 3.3.3](#), geben einen Anhaltspunkt für die Auflösungsgrenze seitens des Spektralphotometers. Das statistische Rauschen auf den Graphen hat etwa eine Amplitude von 0.1 mOD. Staub-Sedimentation und zum Teil Geräteeinstellungen verursachen Verschiebungen der Basislinie, welche durch Abzug eines Untergrunds korrigiert wurden. Die verbleibenden Fehler durch die Untergrund-Korrektur werden zu 0.2 mOD abgeschätzt. Dies entspricht einem relativen Fehler in der Größenordnung von 10^{-3} .

Die Haupt-Fehlerquelle liegt in der Bestimmung der absorbierten Dosis. Hier spielen die Instabilität der Laserleistung, Verunreinigungen der Probe, die Reaktionszeit zum Öffnen und Schließen der Belichtungs-Klappe und die Genauigkeit der Leistungs-Detektion eine Rolle.

Leistungsschwankungen des Lasers führen zu einer stärkeren Streuung der Datenpunkte um ihre Anpassungsgerade. Vergleiche mit früheren Messungen ohne Kontrolle der Eingangsleistung während der Belichtung ergeben mittlere durch diesen Effekt verursachte Abweichungen von etwa 1.5%. Die Genauigkeit der Leistungs-Detektion wird vom Hersteller (*Nova Ophir 3A*) bei 290 nm zu 6% angegeben. Die Linearität der Leistung beträgt laut Datenblatt 1%. Fehler aufgrund von falscher Kalibrierung, Inhomogenität und Alterung des Detektors wurden auf 3% abgeschätzt. Damit liegt der Gesamtfehler der Detektion in der Größenordnung von 10%.

Absorbierende Verunreinigungen der Proben in der Größenordnung von 10% wurden separat korrigiert. Verunreinigungen von bis zu 2% der Hauptfraktionen in den HPLC-Analysen konnten nicht mehr getrennt aufgeschlüsselt werden. Durch vorhandene Fremdmoleküle verursachte Ungenauigkeiten der absorbierten Dosis werden daher mit diesem Zahlenwert abgeschätzt.

Die Klappe zum Beginn und Ende der Belichtungen wurde manuell betätigt. Typische Reaktionszeiten zweckgerichteter Verhaltensänderungen aufgrund unvorhergesehener Ereignisse liegen im Bereich von 1 s. Einschließlich der Vorbereitungsmaßnahmen wird die Ungenauigkeit der Belichtungszeiten aufgrund der manuellen Betätigung der Klappe auf 0.5 s abgeschätzt [[18b](#)]. Eine programmierbare Klappe könnte die Präzision verbessern, jedoch fällt der Fehler gegenüber anderen Einflüssen nicht ins Gewicht.

Drei weitere Größen, die in die Bestimmung der Quantenausbeute eingehen, sind das Probenvolumen, die Extinktionskoeffizienten und die Schichtdicke. Diese sind unabhängig von der Detektion. Das Probenvolumen hängt von der Genauigkeit der Pipettierung ab. Laut Hersteller (*eppendorf*) beträgt der systematische Fehler der verwendeten Einkanalpipetten bis zu 3% und der zufällige Fehler 1%. Aus experimentellen Daten wird der Fehler aufgrund der Pipettierung in guter Übereinstimmung mit den Hersteller-Daten zu 4% abgeschätzt. Es sei an dieser Stelle zu

beachten, dass die zum Teil stark unterschiedlichen Probenstoffmengen zwischen 5 und 25 nmol nicht direkt in (3.11) eingehen. Diese gehen implizit in die Betrachtungen der Strahlungsdosen und Absorptionsänderungen ein.

Die Extinktionskoeffizienten für T(CPD)T und intaktes TT wurden der Literatur entnommen [Pan12]. Ein Vergleich mit [SGZ15] zeigt Unterschiede des TT Koeffizienten von etwa 5%. Die Unterschiede beim T(CPD)T reichen bis 20%. Dieser Wert dominiert die Genauigkeit der Differenz beider Koeffizienten und wird als Fehlerabschätzung verwendet.

Ungenauigkeiten der Schichtdicke können durch die Positionierung der Küvette im Strahlengang oder durch die Küvette selbst entstehen. Für die Parallelität der Oberflächen gibt der Hersteller (*Hellma, QS Suprasil, 10 mm*) 10 μm und für die Genauigkeit der Fensterdicke 3 μm Toleranz an. Die Fehlkalibrierung der Küvette gegenüber dem Einfallslot wird auf bis zu 5° geschätzt. Dadurch verlängert sich der optische Weg durch die Küvette um etwa 0.2%. Insgesamt wurde der Fehler der Schichtdicke auf $3 \cdot 10^{-3}$ geschätzt.

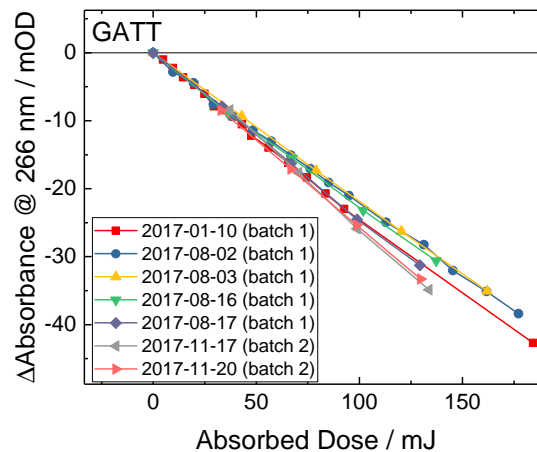


Abbildung 3.11.: Reproduzierbarkeit der Messergebnisse unterschiedlicher Messtage, Zeitabstände und Chargen anhand der Referenzprobe GATT.

Die bisher genannten Beiträge geben in erster Linie einen Anhaltspunkt für die systematischen Fehler. Nach Gaußscher Fehlerfortpflanzung [Stö07] ergibt sich hierfür ein Wert von ca. 12.2%. Eine klare Trennung zu den statistischen Fehlern ist hier nicht möglich. Die Standardabweichungen bei der Mittelung der Steigungen geben jedoch einen Einblick in die statistischen Fehler. Im Mittel betragen diese 6.5%. Daraus ergibt sich ein Gaußscher Gesamtfehler von etwa 13.8%. Zur Verifikation wurde die Probe GATT aufgrund ihrer starken CPD-Schädigung ausgewählt. Diese wurde als Referenz in einigen Messreihen mit gemessen (Abbildung 3.11). Anhand dieser Probe können unterschiedliche Messtage, Chargen (*Hersteller biomers*) und Zeitabstände von bis

zu 10 Monaten miteinander verglichen werden. Die statistischen Schwankungen der Messungen sind vergleichbar mit den weiteren Proben ([Tabelle 3.4](#)). Einen groben Vergleichswert für Fehler bei der experimentellen Bestimmung von Quantenausbeuten gibt [\[Liu16b\]](#) mit ca. 6%. Die Genauigkeit der ermittelten Quantenausbeute wird wesentlich von der Präzision des verwendeten Detektors bestimmt. Diese könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Fehler sein.

3.3.2. Experimentelle Bestimmung der Quantenausbeuten

Die Grundlagen für die Errechnung der Quantenausbeuten wurden in [Abschnitt 3.2.6](#) erläutert. Aus rechnerischer Sicht wird davon ausgegangen, dass nur ein T(CPD)T Schaden pro Molekül entstehen oder repariert werden kann. Es wird angenommen, dass die Reaktion in nur eine Richtung abläuft und dass die Absorptionsänderung bei 266 nm ausschließlich darauf zurückzuführen ist. Folgereaktionen werden vernachlässigt.

| DNA Sample | $\epsilon _{290nm} / M^{-1}cm^{-1}$ | $\epsilon/\epsilon_G _{290nm} / \%$ |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| G | 2599 | 100 |
| A | 114 | 4 |
| C | 1912 | 74 |
| T | 1770 | 68 |
| T=T | 93 | 4 |

Tabelle 3.3.: Molare dekadische Extinktionskoeffizienten der kanonischen DNA-Basen und des T(CPD)T Schadens bei 290 nm ([Pan12](#), [SGZ15](#), vgl. [Abbildung 1.2](#)). Der relative Bezug auf Guanin (rechte Spalte) verdeutlicht, dass die Absorption vorwiegend durch die Basen G, C und T erfolgt.

Die Absorption der einzelsträngigen Oligonukleotide setzt sich in erster Näherung additiv zusammen aus der Absorption der beteiligten Basen bei der Anregungswellenlänge. Die Extinktionskoeffizienten der kanonischen Basen und des T(CPD)T sind bei 290 nm in [Tabelle 3.3](#) gegenübergestellt (vgl. [Abbildung 1.2](#)). Der Bezug auf Guanin zeigt, dass sich die Anregungsenergie vorwiegend auf die Basen G, C und T verteilt.

Experimentell werden die Anzahl und Art der möglichen Photoschäden bzw. der Reparatur durch die Sequenzen vorgegeben. Während der Belichtung laufen sowohl Hin- als auch Rückreaktionen gleichzeitig ab. Die schwachen Belichtungs Dosen geben in Kombination mit den reinen Ausgangsproben in erster Linie Einblicke in Richtung der Primärreaktion.

[Abbildung 3.12 A](#) zeigt exemplarisch Belichtungsergebnisse unterschiedlicher Sequenzen. Dabei wurden Oligonukleotide gegenübergestellt, deren 266 nm Absorptionsänderungen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bildung oder Reparatur genau

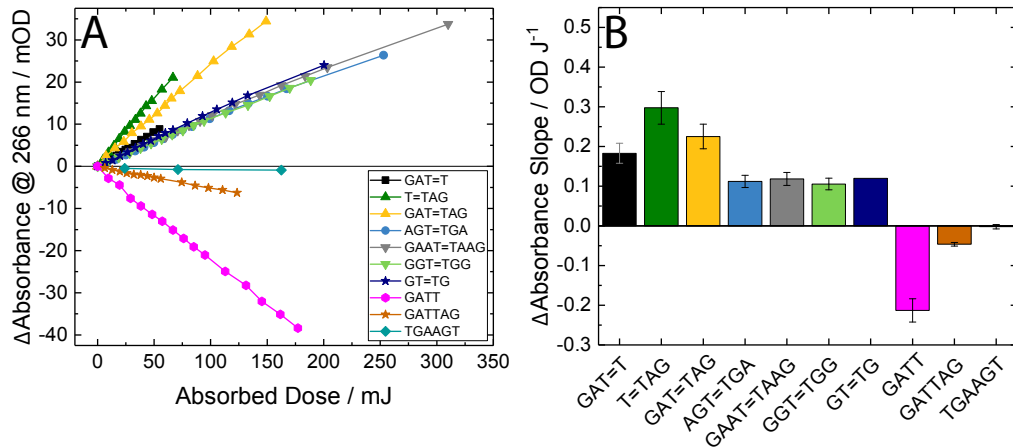


Abbildung 3.12.: A: UV-induzierte Absorptionsänderungen bei 266 nm gegen die in den Proben absorbierte Dosis bei 290 nm (exemplarische Messdaten). B: Steigungen aus linearen Anpassungen zu A, gemittelt über mehrere Wiederholungsmessungen.

eines T(CPD)T Schadens pro Molekül zurückzuführen ist. Als Vergleich dazu ist die Probe TGAAGT aufgeführt, bei der sequenzbedingt kein CPD Schaden entstehen kann. Die Auftragung der Absorptionsänderungen bei 266 nm gegen die absorbierte Dosis bei 290 nm ermöglicht direkte Rückschlüsse auf die Quantenausbeute. Hierzu werden die Graphen linear angepasst und die zugehörigen Steigungen in (3.12) eingesetzt. Die gemittelten Steigungen mehrerer Wiederholungsmessungen sind in [Abbildung 3.12 B](#) gegenübergestellt. Eine Gegenüberstellung der aus den Steigungen berechneten Quantenausbeuten findet sich in [Tabelle 3.4](#).

| DNA Sample | $m_{CPD} / OD J^{-1}$ | ϕ_{CPD} (Conversion) / % |
|------------|-----------------------|-------------------------------|
| GAT=T | 0.18 ± 0.03 | 0.32 ± 0.05 |
| T=TAG | 0.30 ± 0.04 | 0.53 ± 0.07 |
| GAT=TAG | 0.23 ± 0.03 | 0.36 ± 0.05 |
| AGT=TGA | 0.11 ± 0.02 | 0.20 ± 0.03 |
| GAAT=TAAG | 0.12 ± 0.02 | 0.21 ± 0.03 |
| GGT=TGG | 0.11 ± 0.01 | 0.19 ± 0.03 |
| GT=TG | $0.12 \pm > 0.02$ | $0.21 \pm > 0.03$ |
| GATT | -0.21 ± 0.03 | 0.38 ± 0.05 |
| GATTAG | -0.046 ± 0.006 | 0.08 ± 0.01 |

Tabelle 3.4.: Quantenausbeuten der T(CPD)T Reparatur bei schwachen Belichtungs Dosen von 290 nm. Bei GATT und GATTAG beschreiben die ϕ_{CPD} die Photoschädigung. Die Steigungen der Kurven in [Abbildung 3.12](#) wurden durch lineare Anpassung bestimmt und die Quantenausbeute gemäß (3.12) berechnet.

5' vs. 3' Ende Anhand der Ergebnisse von GAT=T, T=TAG und GAT=TAG lassen sich Unterschiede im Reparaturverhalten von benachbarten Basen am 5' bzw. 3' Ende der Sequenz ableiten. Würde die Position der Nachbarbasen am 5' oder 3' Ende des T(CPD)T Schadens keine Rolle spielen, hätten alle drei Sequenzen ähnliche Steigungen. Die Steigung von der T=TAG Probe ist am größten (dunkelgrüne Kurve), was mit einer starken CPD Reparatur Aktivität des ladungsgetrennten Radikalpaares $A^{\bullet-}G^{\bullet+}$ vom 3' Ende assoziiert wird. Die Reparatur durch das Radikalpaar $G^{\bullet+}A^{\bullet-}$ vom 5' Ende ist deutlich schwächer (schwarz). Im Experiment liegt die Steigung der GAT=TAG Probe (gelb) zwischen den Steigungen von GAT=T und T=TAG. Dies spricht dafür, dass GAT=TAG als Kombination der beiden Tetramere aufgefasst werden kann.

Von Pan et al. [Pan12] wurden die Trinukleotide AT=T, T=TA und GT=T, T=TG bei Belichtung mit 280 nm auf ihre Reparatüreigenschaften untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Position der benachbarten Basen am 3' oder 5' Ende gefunden. Dieses Verhalten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Es wird angenommen, dass die leicht unterschiedliche Anregungswellenlänge zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Ursachen hierfür könnten in den Einflüssen der zweiten Nachbarbase auf die Reparatur liegen. Durch die zweite Nachbarbase kann ein ladungsgetrenntes Radikalpaar neben dem Schaden entstehen, welches die Reparatur hervorruft [Sza18].

Protonen-induzierte Reparatur Werden die an den T(CPD)T Schaden angrenzenden Dinukleotide in ihrer Reihenfolge zu AGT=TGA invertiert, so reduziert dies die Reparatur. Gemäß der Redoxpotentiale der einzelnen DNA-Basen (Tabelle 3.1) entstünde hier $G^{\bullet+}$ angrenzend an den Schaden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Reparatur des T(CPD)T Schadens in diesem Fall durch ein angrenzendes Proton ausgelöst wird.

Abstand des Guanins zum CPD Schaden Die Frage, welche Rolle der Abstand des Guanins zum CPD-Schaden in Bezug auf die Reparaturaktivität spielt, wurde durch einen Vergleich der Sequenzen GT=TG und GAAT=TAAG mit GAT=TAG untersucht. Wie im Fall von GT=T und T=TG [Pan12], tritt bei GT=TG Reparatur auf. Im Unterschied zu GAT=TAG kann bei GT=TG kein ladungsgetrenntes Radikalpaar auf den benachbarten Basen entstehen. Überdies beträgt die Lebensdauer des angeregten dGMP weniger als 1 ps [ZIK13]. Folglich muss der Reparatur von GT=TG ein unterschiedlicher Mechanismus zu Grunde liegen. Dieser ist derzeit noch nicht im Detail geklärt. Denkbar wäre beispielsweise, dass G als Elektronendonator direkt ein Elektron an den CPD-Schaden abgibt oder das $G^{\bullet+}$ die Reparatur auslöst.

Trotz des größeren Abstandes zum T(CPD)T Schaden, zeigt das Oligonukleotid GAAT=TAAG eine mit GT=TG oder AGT=TGA vergleichbare Reparatur. Hierfür

gibt es unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Der Großteil des Anregungslichts wird im G absorbiert ([Abbildung 1.2](#)). Eine Möglichkeit wäre, dass die Reparatur durch einen langlebigen ladungsgetrennten Zustand zwischen G und A hervorgerufen wird. Ob der CT Zustand die Ladungsverteilung im Oligonukleotid für die Reparatur begünstigt oder ob ein Ladungssprung [[Mur93](#)] zum T(CPD)T stattfindet, sind offene Fragestellungen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Reparatur durch einen CT Zustand zwischen den Adeninen. Die Reparatur ist schwächer als bei der Sequenz GAT=TAG. Gründe hierfür können sein, dass in GAT=TAG die für die Reparatur notwendigen Radikal-Anionen direkt an die Schadstelle angrenzen.

G als Radikal-Anion In den bisher aufgeführten Sequenzen ist G aufgrund seines Redoxpotentials ([Tabelle 3.1](#)) in ladungsgetrennten Radikalpaaren als Elektronendonator aufgetreten. Im Fall einer Ladungstrennung von GG, würde eines der beiden Guanine als Elektronenakzeptor auftreten. Die beiden Konformationen $G^{\bullet+}G^{\bullet-}$ und $G^{\bullet-}G^{\bullet+}$ wären jedoch nicht trennbar. Der Reparaturreffekt von GGT=TGG ist vergleichbar zu dem von AGT=TGA.

Sollte sich der ladungsgetrennte Zustand bei GG aus energetischen oder sterischen Gründen nicht bilden, wäre eine weitere Möglichkeit, dass das an den T(CPD)T angrenzende G durch die UV-Anregung den Schaden repariert. Untermuert wird diese Hypothese von der ähnlichen Reparatur der Probe GT=TG. Die Quantenausbeute der Reparatur von GT=TG liegt in der Größenordnung von GT=T und T=TG [[Pan12](#)].

CPD Schädigung Eine starke Schädigung tritt bei der Sequenz GATT auf. Diese ist etwas stärker als die Reparatur von GAT=T, jedoch schwächer als von T=TAG. Die Quantenausbeute der Schädigung von TT bei 290 nm ist mit 0.38% im GATT-Strang erheblich niedriger als 1 bis 2% im Absorptionsmaximum des Dinukleotids bei 268 nm [[Sch09](#)]. Dass benachbarte Purine die CPD Schädigung reduzieren können, wurde bei Belichtung mit 240 nm und 280 nm gezeigt [[Pan12](#)]. Ein ähnlicher Effekt wurde bei den Sequenzen GATT und GATTAG beobachtet. Die Schädigung von GATTAG ist wesentlich kleiner als die von GATT. Gründe hierfür könnten unter anderem in der stärkeren Basenstapelung und in der Geometrie des Moleküls liegen.

Die Probe TGAAGT selbst bildet keine CPD Schäden und dient daher als photostabile Vergleichsprobe. Die sehr geringe Absorptionsänderung bei 266 nm gibt Auskunft über die Zerstörung der Basen z. B. aufgrund der Bildung von AA-Photoschäden oder der Schädigung von T. Die Absorptionsänderungen sind jedoch gering im Vergleich zu den CPD Effekten und unterstreichen, dass die beobachteten Effekte bei den anderen Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit aus CPD Reparaturen bzw. CPD Bildungen resultieren.

Die Schädigung von GCT=TCG ([Abbildung 3.9](#)) lässt sich nicht direkt vergleichen und wurde daher nicht mit aufgetragen. Das Minimum der Absorptionsabnahme bei 273 nm deutet auf die Entstehung anderer Photoschäden hin. Das Ergebnis unterstreicht die Hypothese, dass Purine in der Nachbarschaft von T(CPD)T Schäden deren Reparatur unterstützen, Pyrimidine dagegen nicht. Die Größenordnung der hier ermittelten Reparatur-Quantenausbeuten stimmt mit der Literatur überein [[Pan12](#)].

Benachbarte Purin-Dinukleotide DNA-Stränge mit Purin-Dinukleotiden in der Nachbarschaft von T(CPD)T Schäden zeichnen sich gegenüber Pyrimidin Kombinationen durch intrinsische Reparatureigenschaften aus. Aus den Daten für GT=TG, GAT=TAG und GAAT=TAAG geht hervor, dass die Reparatureffizienz bei je zwei benachbarten Basen am höchsten ist. Daher sollen im Folgenden die vier möglichen Purin-Dinukleotid-Kombinationen GA, AG, GG und AA in symmetrischer Anordnung um den T(CPD)T Schaden explizit miteinander verglichen werden. Der Schwerpunkt der Betrachtungen soll auf den Einflüssen der benachbarten Basen liegen.

In den bisherigen Betrachtungen wurde nicht zwischen der Reparatur des T(CPD)T Schadens aufgrund der direkten Absorption des T=T oder durch benachbarte Basen unterschieden. Die bisher vorgestellten CPD-Proben waren optisch dicht. Es kann in guter Näherung angenommen werden, dass nahezu die komplette Belichtungsleistung außerhalb des T(CPD)T Schadens absorbiert wird (vgl. nächster Abschnitt). Die direkte Photoreparatur des T(CPD)T [[HIR07](#)] wird bei dieser Betrachtung vernachlässigt.

Die Situation ändert sich bei optisch dünnen Proben, wie im Fall von AAT=TAA. Aufgrund seines niedrigen Extinktionskoeffizienten bei 290 nm von ca. $114 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ hat Adenin eine ähnliche Absorption wie der T=T mit $93 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Tabelle 3.3](#)). Der vom T=T absorbierte Anteil der Belichtungsleistung kann nicht länger vernachlässigt werden. Eine Korrektur auf die vom T=T absorbierte Dosis gestaltet sich als schwierig. Daher werden Daten optisch dünner Proben gegen die Belichtungsleistung aufgetragen ([Abbildung 3.13 A](#)). Die Absorptionsänderungen wurden zur Vergleichbarkeit auf ihre Soll-Stoffmenge von 15 nmol skaliert. Nach der Umrechnung auf gleiche Konzentrationen, können die Graphen von T=T und AAT=TAA voneinander abgezogen werden. Aufgrund von Leistungsschwankungen des Lasers unterscheiden sich die Dosiswerte für jede Kurve. Die T=T Kurve wurde daher linear angepasst und die Anpassungswerte als lineare Interpolation verwendet. Die um die Eigenreparatur bereinigte Differenz wird als AA(T=T)AA bezeichnet. Analog wurde bei den weiteren Proben vorgegangen. Für die optisch dichten Proben wurde die zuvor ermittelte absorbierte Leistung übernommen, da in guter Näherung davon ausgegangen werden kann, dass T=T verglichen mit G nicht absorbiert.

Für AAT=TAA wurde die absorbierte Dosis, gemäß den obigen Extinktionskoeffizienten für A und T=T, um einen Faktor von 0.83 korrigiert. Der Wert ist verhältnismäßig klein und somit stärker fehlerhaftet, was sich auf die Steigung der Kurve auswirkt. Aus der Auftragung gegen die absorbierte Dosis in [Abbildung 3.13 B](#) geht hervor, dass alle benachbarten Purin-Paare fördernd auf die Reparatur des T(CPD)T Schadens wirken.

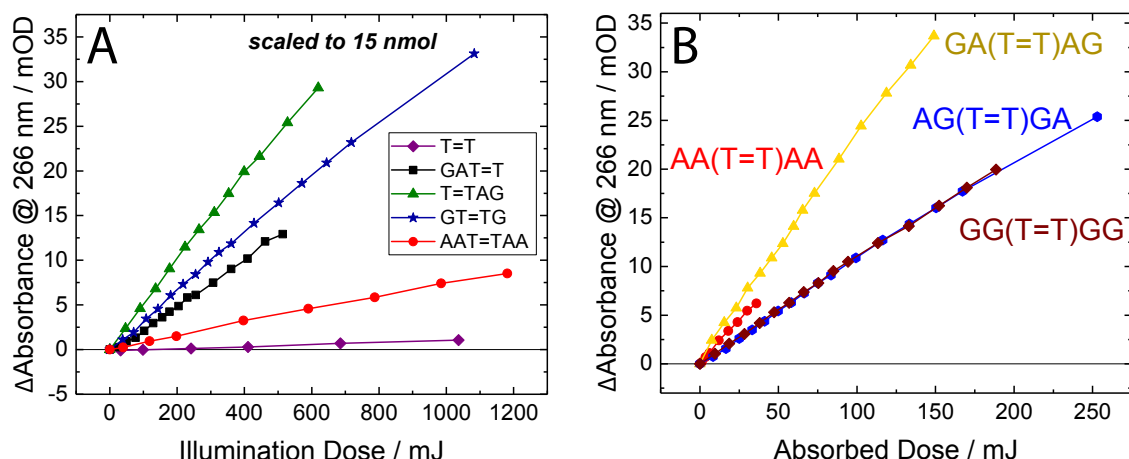


Abbildung 3.13.: A: Absorptionsänderung bei 266 nm gegen die Belichtungsdosis bei 290 nm von optisch dünnen Proben. Zur Vergleichbarkeit wurden alle Daten auf eine Stoffmenge von 15 nmol skaliert. B: Absorptionsänderungen bei 266 nm abzüglich der direkten T(CPD)T Photoreparatur gegen die in den intakten Nachbarbasen absorbierte Belichtungsdosis bei 290 nm. Bei der schwach absorbierenden Probe AAT=TAA wurde die absorbierte Dosis mit einem Faktor 0.83 korrigiert.

Belichtungsdosis bei optisch dichten Proben Die Auswertung der Belichtungsexperimente erfolgte auf Grundlage des Beer-Lambert-Gesetzes (3.3). Eine Herausforderung stellt der Vergleich optisch dünner mit optisch dichten Proben dar. Ein solcher Versuch wurde für die Korrektur der in T(CPD)T absorbierten Dosis ([Abbildung 3.13 B](#)) unternommen. Die Auftragung der Belichtungsdosis für optisch dünne Proben ([Abbildung 3.13 A](#)) impliziert die Annahme, dass sich die Strahlungsleistung, der die Proben-Moleküle ausgesetzt sind, auf dem Weg durch die Probe kaum merklich reduziert. Die Absorptionsänderung, bezogen auf diese Leistung, ist in allen Teilen der Probe in etwa gleich. Bei optisch dichten Proben erhalten Moleküle bei größeren Schichttiefen merklich weniger Strahlungsleistung als die Moleküle im Eintrittsbereich des Strahlenganges. Demnach sinkt die Absorbanz-Änderung der Moleküle auf dem Weg durch die Küvette. Wird die Gesamt-Änderung der Absorbanz gegen die Eingangsleistung aufgetragen, so wird mit dieser Annahme die tatsächlich wirkende Belichtungsleistung überschätzt. Für die optisch dünnen Proben in [Abbildung 3.13 A](#)

wurde dieser Effekt bisher vernachlässigt. Nun soll dessen Größenordnung abgeschätzt werden.

Der exponentielle Abfall der Eingangsleistung beim Durchlaufen der Küvette wird von (3.2) beschrieben. Integration über die Schichtdicke d und Normierung auf dieselbe ergeben die mittlere Eingangsleistung \bar{P} .

$$\bar{P} = \frac{1}{d} \int_0^d P(z) dz = \frac{P(0)}{d} \int_0^d e^{-az} dz \quad (3.14)$$

$$\bar{P} = \frac{P(0)}{a \cdot d} \cdot (1 - e^{-ad}) \quad (3.15)$$

$$a = \ln(10) \cdot c \cdot \epsilon \quad (3.16)$$

Der Absorptionskoeffizient a ergibt sich aus der Umrechnung von (3.2) in die dekadische Basis. Unter Verwendung von (3.16) und (3.3) wird (3.15) zu (3.17):

$$\bar{P} = P(0) \cdot \frac{1 - 10^{-A}}{\ln(10) \cdot A} \quad (3.17)$$

Somit ergibt sich ein Korrekturfaktor für die Eingangsleistung absorbierender Proben. Mit den Messwerten für die Absorbanz A kann dieser für die Proben in [Abbildung 3.13](#) A errechnet werden. Für die sehr schwach absorbierenden Proben T=T und AAT=TAA ist dieser nahezu 1. Für GAT=T und T=TAG 0.94 und für GT=TG 0.89. Die aufgetragenen Leistungen in [Abbildung 3.13](#) A überschätzen die tatsächlichen Leistungen nur geringfügig und können daher in guter Näherung verwendet werden. Im Zähler von (3.17) steckt die absorbierte Leistung.

3.3.3. Ergebnisse der Doppelstrang-Experimente

Die bisher aufgeführten Reparatureigenschaften beziehen sich durchgehend auf kurze Sequenzen einzelsträngiger Proben. Im natürlichen Genom liegt die DNA allerdings doppelsträngig vor. Dies wirft die Frage auf, ob T(CPD)T Schäden innerhalb doppelsträngiger Sequenzen auf ähnliche Weise repariert werden können. Mit der Beteiligung zusätzlicher Basen steigt die Komplexität der stattfindenden Reaktionen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit kurze Sequenzen mit Haarnadel-Struktur untersucht. Die Stabilität der doppelsträngigen Strukturen bei Laborbedingungen wurde mit Hilfe von Schmelzkurven untersucht.

Schmelzkurven Die Integration eines T(CPD)T Schadens beeinflusst die Geometrie des Doppelstranges erheblich [Ban09]. Insbesondere bei kurzen Sequenzen besteht daher die Gefahr, dass ein großer Anteil der Moleküle in den Proben bei Raumtemperatur einzelsträngig vorliegt. Einblicke in die Verteilung doppelsträngiger gegenüber einzelsträngiger Moleküle liefern die Schmelzkurven der Proben DS ACT=TCA und DS ACTTCA (Abbildung 3.14) nach der in Unterabschnitt 3.2.7 beschriebenen Messmethode. Die Absorptionsänderung bei 260 nm verglichen zur raumtemperierten Referenzprobe ist gegen die Temperatur aufgetragen. Die Datenpunkte (schwarz) wurden durch Logistic Kurven (rot gestrichelt) angepasst. Die Wendepunkte der Anpassungskurven geben Auskunft über die Schmelzpunkte der Proben. Diese wurden durch zweifache Ableitung der Anpassungskurven ermittelt. Die Nulldurchgänge der Kurven liegt in der Nähe der Temperatur der Referenzküvette von 24°C. Abweichungen sind auf leichte Unterschiede in den Konzentrationen zurückzuführen.

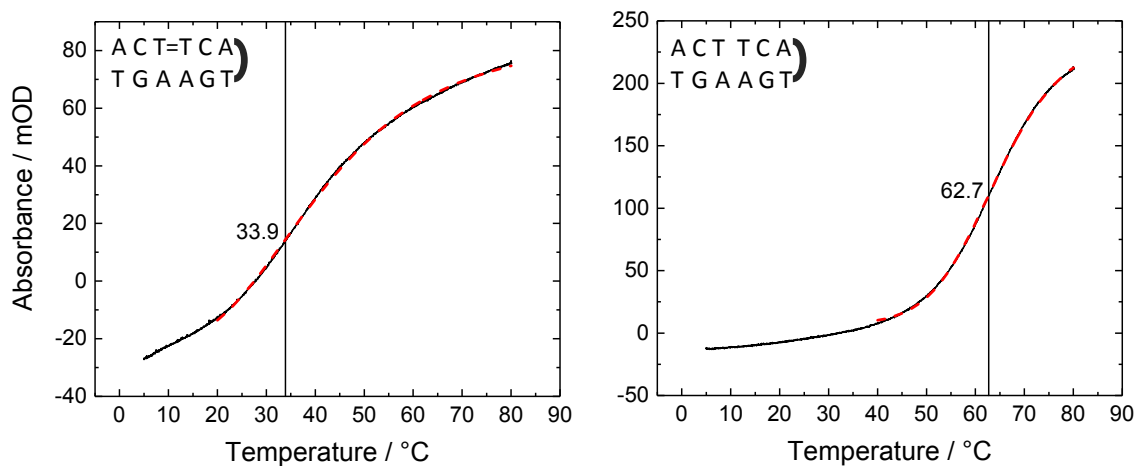


Abbildung 3.14.: Schmelzkurven der HEGL-verknüpften Doppelstränge DS ACT=TCA und DS ACTTCA (schwarz) gegen eine raumtemperierte Referenzküvette. Die Schmelzpunkte (durch senkrechte Linien gekennzeichnete Wendepunkte im Bild) wurden ermittelt durch Logistic Kurven Anpassungen an die Datenpunkte (rot gestrichelt) und zweifache Ableitung.

Ihrer Geometrie entsprechend weist die CPD-geschädigte Probe mit 33.9°C einen erheblich niedrigeren Schmelzpunkt auf als die intakte Sequenz bei 62.7°C. Die Schmelzkurve der Probe DS GAT=TAG wurde in [Buc16] bereits beschrieben. Der Schmelzpunkt wurde zu 42°C bestimmt. Es ist anzunehmen, dass die zugehörige intakte Sequenz über einen höheren Schmelzpunkt verfügt. Die Belichtungsexperimente wurden bei einer Raumtemperatur von 23°C durchgeführt. Nach den vorliegenden Ergebnissen lag bei dieser Temperatur der Großteil der Moleküle in allen gemessenen Proben doppelsträngig vor.

HPLC-Analysen der Doppelstränge In den HPLC-Analysen wurde bei allen untersuchten Doppelstrang-Sequenzen ein höherer Anteil an Nebenfraktionen als bei den Einzelsträngen gefunden. [Abbildung 3.15](#) stellt die HPLC Analysen der Doppelstrang-Sequenzen gegenüber.

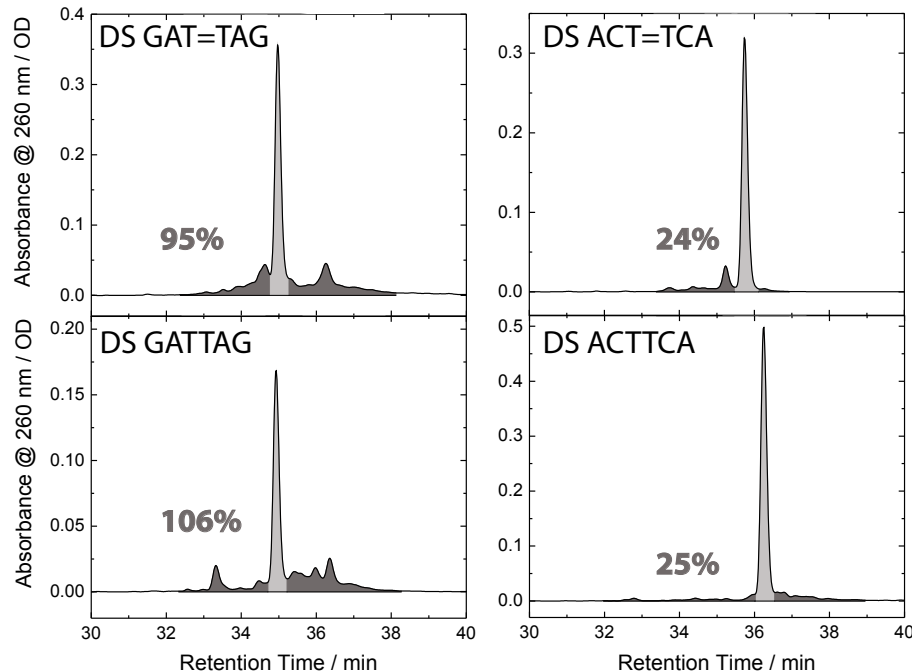


Abbildung 3.15.: Untergrund korrigierte HPLC Analysen der Doppelstrang-Sequenzen mit Haarnadel-Struktur bei Raumtemperatur. Der Zahlenwert in den Abbildungen repräsentiert das Verhältnis der Nebenfraktionen (dunkelgraue Flächen) zu den Hauptfraktionen (hellgraue Flächen).

Die Flächen der Nebenfraktionen sind dunkelgrau gekennzeichnet. Die Flächenverhältnisse der Neben- zu den Hauptfraktionen betragen in den einzelnen Fällen nach Basislinien-Korrektur: 25% (DS ACTTCA), 24% (DS ACT=TCA), 106% (DS GATTAG) und 95% (DS GAT=TAG). Neben Verunreinigungen, könnte der hohe Flächenanteil auf die Analyse bei Raumtemperatur zurückzuführen sein. Eine Mischung verschieden geöffneter Haarnadel-Konformationen könnte unterschiedlich an der HPLC-Säule haften. Es ist nicht auszuschließen, dass während der Belichtung bei Raumtemperatur auch eine Mischung unterschiedlicher Konformationen vorlag. Gemäß dem Verhalten einzelsträngiger Oligonukleotide, müssten offene Haarnadel-Strukturen stärkerer Schädigung unterliegen als geschlossene. Dies hätte zur Folge, dass die Absorptionsänderung der Doppelstränge durch die Belichtung überschätzt würde und in Richtung einer flacheren Steigung korrigiert werden müsste. Verunreinigungen in den Proben würden dazu führen, dass die tatsächlich von der Probe absorbierte Strahlungsdosis überschätzt würde, was bei Korrektur in einer höheren

Steigung der Kurven resultieren würde. Beide Effekte sind quantitativ schwer zu erfassen und kompensieren sich in Bezug auf die Steigung gegenseitig. Die Messdaten sollten jedoch unter Berücksichtigung der genannten Punkte betrachtet werden. Der Zusatz von NaCl diene der Stabilisierung der Doppelstrang-Proben und der Simulation biologischer Bedingungen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde dieselbe Menge NaCl auch den Einzelstrang-Proben zugegeben. In früheren Messungen wurde NaCl nur bei den Doppelstrang-Proben zugesetzt. Die experimentellen Daten weisen jedoch darauf hin, dass im Fall der einzelsträngigen Proben kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Messreihen besteht.

Absorptionsänderungen bei 271 nm Ein Teil der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits in [Buc16] präsentiert. Dabei wurde die stark reparierende Sequenz GAT=TAG in ihrer doppelsträngigen Form untersucht. Vergleiche mit den zugehörigen Einzelsträngen und dem intakten Doppelstrang zu GATTAG sollten Einblicke in die Funktionsweise des Reparatur-Mechanismus bezogen auf das Genom geben.

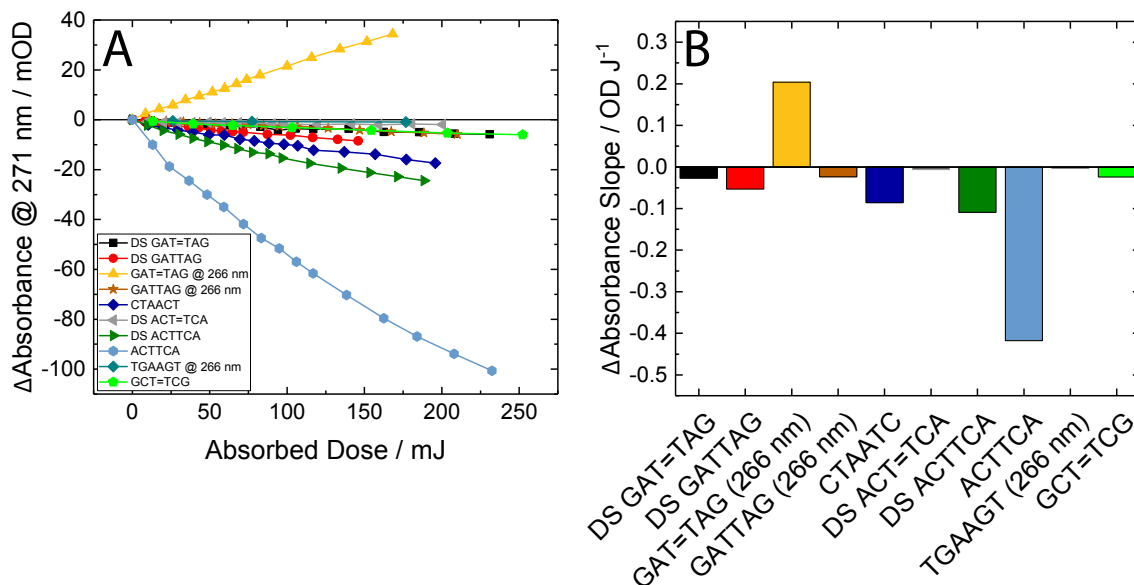


Abbildung 3.16.: A: UV-induzierte Absorptionsänderungen bei 271 nm gegen die in den Proben absorbierte Dosis bei 290 nm (exemplarische Messdaten). B: Steigungen aus linearen Anpassungskurven zu A, gemittelt über mehrere Wiederholungsmessungen.

Neben den Einflüssen der direkten Nachbarbasen, besteht im Doppelstrang darüber hinaus die Möglichkeit über die Basenpaarungen hinweg Ladungen zu transferieren [Zha15]. Dies führte zur Fragestellung, ob GA bzw. AG Dinukleotide am Gegenstrang zum T(CPD)T Schaden den Doppelstrang stabilisieren oder gar reparieren können?

Für Antworten auf diese Fragen werden im Folgenden die doppelsträngigen Sequenzen GAT=TAG und ACT=TCA mit ihren intakten Äquivalenten verglichen.

In den Doppelstrang-Sequenzen sind die T(CPD)T Schäden nicht mehr auf Thymin-Dimere eingeschränkt, sondern es treten auch C(CPD)T und T(CPD)C Kombinationen auf. In der aktuellen Literatur finden sich keine präzisen Angaben zu den entsprechenden Extinktionskoeffizienten bei 290 nm. Es wird angenommen, dass diese ähnlich klein sind wie der Extinktionskoeffizient von T(CPD)T. Folglich werden die Schäden nicht direkt beobachtet, sondern durch eine Absorptions-Abnahme der zugehörigen intakten Basen. Aus diesem Grund muss berücksichtigt werden, dass sich das Minimum in den Differenzspektren in Richtung der C Absorption ([Abbildung 3.9](#)) zu 271 nm verschiebt. Die Differenzspektren aller CT oder TC enthaltenden Proben wurden daher bei 271 nm ausgewertet. Die Ergebnisse sind in [Abbildung 3.16](#) aufgetragen. Für Proben mit nur einem TT Dinukleotid oder T(CPD)T wurden die Absorptionsänderungen bei 266 nm aus [Unterabschnitt 3.3.2](#) übernommen. Diese sind als solche gekennzeichnet.

Anzahl der CPD Möglichkeiten Zunächst fällt auf, dass alle doppelsträngigen Proben bei UV-Belichtung in der Reihenfolgen DS ACT=TCA < DS GAT=TAG < DS GATTAG < DS ACTTCA geschädigt werden. Wo bei den einzelsträngigen Sequenzen in [Unterabschnitt 3.3.2](#) sequenzbedingt nur eine CPD-Bildung oder Reparatur stattfinden konnte, bestehen in den doppelsträngigen Sequenzen nun mehrere Möglichkeiten für Pyrimidin-Dimer Schäden. Diese sind schematisch in [Abbildung 3.17](#) eingezeichnet.

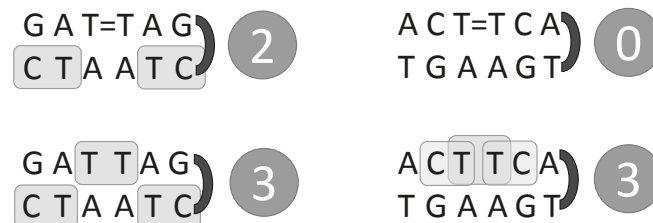


Abbildung 3.17.: Schematische Darstellung der Doppelstrang-Proben mit Anzahl der Möglichkeiten für eine CPD-Schädigung.

Die Stärke der Absorptionsänderung aufgrund der Schädigung nimmt mit der Anzahl der vorhandenen Schadens-Positionen zu. Eine Ausnahme bildet die Sequenz DS ACTTCA, welche über 3 mögliche Positionen zur CPD Bildung verfügt. Dass in der Praxis nur ein oder zwei CPD Schäden gleichzeitig entstehen können, geht erst bei höheren Belichtungs Dosen ein. Die Sequenz DS GATTAG verfügt kombinatorisch ebenfalls über 3 Möglichkeiten, einen CPD Schaden zu bilden. Dennoch weist die Sequenz DS ACTTCA bei gleicher Basen-Zusammensetzung die größte negative Absorptionsänderung bei Belichtung auf. Dies weist darauf hin, dass die vier benach-

barten Pyrimidine sich fördernd auf die Schadensbildung auswirken. Untermuert wird diese Beobachtung durch die starke Schädigung von ACTTCA, verglichen mit der Summe aus CTAATC und GATTAG. Trotz der gleichen Anzahl an Möglichkeiten zur Bildung eines CPD Schadens überwiegt die Schädigung von ACTTCA deutlich. Eine Ursache könnte die Stapelung der Basen sein. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die Studien von [Sch09], wobei in Thymin-20mer-Strängen einen Faktor 2 bis 3 höhere T(CPD)T Quantenausbeuten als im Dinukleotid gemessen wurden.

Die Messung der einzelsträngigen ACT=TCA Probe ist in [Abbildung 3.16](#) nicht aufgeführt. Der Hintergrund ist, dass herstellerbedingt von dieser Probe nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung standen, wodurch die Probenkonzentration entsprechend reduziert werden musste. Ein Vergleich der Belichtungs- bzw. absorbierten Dosen ist nicht möglich. Die Untergrund korrigierten Differenzspektren für ACT=TCA sind in [Abbildung 3.18](#) aufgeführt.

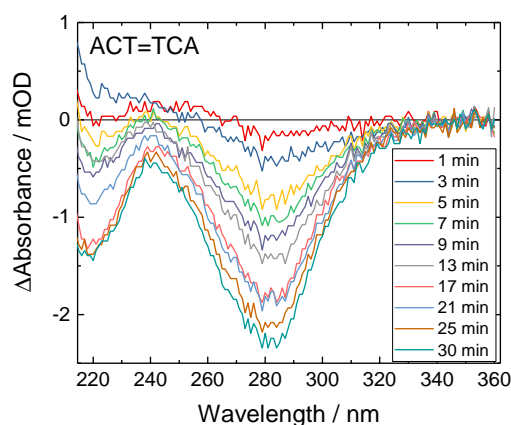


Abbildung 3.18.: Differenzspektren des Einzelstranges ACT=TCA in sehr geringer Konzentration nach UV-Belichtung bei 290 nm. Korrekturen: Mittelung über zwei Spektren je Belichtungsstufe, Abzug der unbelichteten Spektren und des Untergrunds bei rund 360 nm.

Die Absorptionsänderung im Minimum der Differenzspektren von ACT=TCA ist mit etwa -2 mOD vergleichbar mit der geringen Schädigung von TGAAGT. Der Unterschied liegt in der wesentlich kleineren Konzentration von ACT=TCA gegenüber TGAAGT. Die Skalierung auf gleiche Konzentrationen lässt eine merkliche Schadensbildung von ACT=TCA erwarten. Als Anhaltspunkt hierfür dient die Probe GCT=TCG. G ist ein stärkerer Elektronendonator als A ([Tabelle 3.1](#)). Die zugehörigen ladungsgetrennten Zustände haben allerdings eine kürzere Lebensdauer [Tak08]. Insofern gibt die Probe GCT=TCG einen sehr groben Hinweis auf das mögliche Verhalten von ACT=TCA. Im Doppelstrang DS ACT=TCA dürfte der Hauptbeitrag zur Schädigung vom ACT=TCA Strang stammen.

Bemerkenswert ist außerdem die spektrale Lage der Bande bei 282 nm, welche gegenüber den weiteren Proben rotverschoben ist (vgl. [Abbildung 3.9](#)). Dies könnte

darauf hinweisen, dass aufgrund der Belichtung zusätzlich Schäden am C auftreten. Die Doppelstränge DS ACTTCA und DS ACT=TCA weisen eine ähnliche Bande auf. Dies legt nahe, dass Schäden am Cytosin eine Rolle bei der Schädigung der zugehörigen Doppelstränge spielen könnten.

Pyr(6-4)Pyr Schadensbildung Die Differenzspektren der Sequenz DS ACTTCA ([Abbildung 3.9](#)) verfügen über eine ausgeprägte Absorptionszunahme bei 318 nm. Dieselbe Bande tritt beim einzelsträngigen ACTTCA bei vergleichbarer Belichtung ebenfalls auf und ist etwa einen Faktor 3 kleiner. Bei den restlichen Proben ist die Bande weniger stark ausgeprägt. Die Absorptionszunahme bei 318 nm könnte auf die Bildung des T(6-4)T Schadens hinweisen [[SGZ15](#)]. Es ist davon auszugehen, dass außerdem C(6-4)T und T(6-4)C entsteht. Dass der genannte Effekt bei der Sequenz ACTTCA und ihrem entsprechenden Doppelstrang stärker ausgeprägt ist als bei den anderen untersuchten Sequenzen, legt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Pyr(6-4)Pyr-Schadensbildung in Zusammenhang mit der direkten Nachbarschaft und der Basenstapelung der Pyrimidine steht.

Doppelstränge reduzieren Schädigung und Reparatur In diesem Abschnitt sollen Unterschiede in der Photoreaktivität zwischen Doppel- und ihren korrespondierenden Einzelsträngen herausgearbeitet werden. Die Fälle von DS GAT=TAG und DS GATTAG wurden bei 266 nm im Rahmen von [[Buc16](#)] diskutiert und sollen hier unter Berücksichtigung der CT und TC Schäden bei 271 nm aufgegriffen werden. In [Abbildung 3.16 B](#) sticht der Einzelstrang GAT=TAG (gelb) durch seine Netto-Reparatur hervor. Der Betrag der Absorptionsänderung durch die Schädigung des Gegenstranges CTAATC (dunkel blau) ist kleiner. Zu erwarten wäre demnach eine Netto-Reparatur des Doppelstranges DS GAT=TAG, welche jedoch nicht auftritt. Anstelle dessen tritt eine schwache Folgeschädigung des Stranges.

Das extreme Gegenteil verkörpert der Doppelstrang DS ACTTCA (dunkelgrün) in Richtung der Schädigung. Die Zusammensetzung aus dem sehr stark schädigenden Einzelstrang ACTTCA (hell blau) und dem nahezu photostabilen TGAAGT (türkis) lässt eine ebenfalls starke Schädigung des Doppelstranges vermuten. Diese fällt im Experiment deutlich schwächer aus, als es die Einzelstränge nahe legen. Das Verhalten von DS GATTAG (rot), verglichen mit seinen zugehörigen Einzelsträngen (braun und dunkel blau), ist diesem ähnlich. Bei DS ACT=TCA liegen keine Daten für ACT=TCA unter gleichen Messbedingungen vor. Die Extrapolation von geringen Mengen und der Vergleich mit GCT=TCG legen auch hier Ähnlichkeiten nahe.

Die Ursache für die beschriebenen Effekte könnte sein, dass die im Einzelstrang gebildeten ladungsgetrennten Zustände im Doppelstrang zu einem gewissen Grad reduziert oder gar unterdrückt werden. Die Watson-Crick-Basenpaarungen beeinflussen die Ladungsverteilung im Molekül derart, dass die Lebensdauer der reaktiven Zustände verringert wird [[Buc14b](#)]. Studien von [[Zha15](#)] stellen Proton-Transfer-

Mechanismen zum Gegenstrang vor. Die Anregungsenergie ultraschnell im Molekül und an die Umgebung zu verteilen und somit unschädlich zu machen, zählt zu den natürlich Abwehrmechanismen des Genoms gegen schädliche UV-Strahlung [CCK05]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass derartige Mechanismen sowohl die weitere Schädigung als auch die Selbstreparatur reduzieren. Gerade aber die Verteilung der Anregungsenergie über den Strang hinweg, könnte ein Hintergrund für die besondere Photostabilität des Doppelstranges DS ACT=TCA sein. Die sterische Deformation des Doppelstranges aufgrund des T(CPD)T [Ban09] könnte dafür verantwortlich sein, dass sich auf dem Gegenstrang zu einem gewissen Grad langlebige GA, AA, AG Radikalpaare bilden können. Diese könnten durch Ladungstransfer die im Einzelstrang beobachtete weitere Schädigung des ACT=TCA hemmen. Dass die Ladungsverteilung auf dem Gegenstrang einen vorhandenen T(CPD)T Schaden sogar reparieren könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Sie beeinflusst jedoch dessen Photostabilität.

3.3.4. HPLC-Analyse reparierter Einzelstränge

Neben den spektroskopischen Untersuchungen wurden als zusätzlicher Nachweis für die Photoreparatur HPLC-Analysen der belichteten Proben durchgeführt (Abbildung 3.19). In den Graphen wurde die jeweilige Absorbanz bei 260 nm gegen die Retentionszeit aufgetragen. Die Graphen sind nach Probengruppen sortiert. Die Spuren innerhalb einer Gruppe wurden unmittelbar nacheinander aufgenommen. In der Darstellung wurden innerhalb der Gruppen gleiche Skalierungen eingehalten. Dadurch sind die Höhen der Maxima unmittelbar miteinander vergleichbar. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass durch die geringe Absorbanz von T=T bei 260 nm, die Flächen der Maxima relativ zu den intakten Sequenzen nicht direkt die Mengenverhältnisse widerspiegeln, sondern etwa einen Faktor zwei geringer sind.

Die erste HPLC-Spur innerhalb jeder Gruppe nimmt die jeweils unbelichtete Probe ein. Hier ist bei allen Proben das T(CPD)T geschädigte Molekül als Hauptfraktion zu sehen. Es folgt die Spur der belichteten Probe am Ende der Versuchsreihen in Abbildung 3.12. Die angegebenen Energien entsprechen der von der Probe absorbierten UV-Strahlungsdosis. Zusätzlich zur geschädigten Fraktion tritt bei allen reparierenden Proben eine kleine Fraktion des intakten Moleküls auf. Verfahrensbedingt kann es bei aufeinanderfolgenden Messungen zu leichten Verschiebungen der Retentionszeiten kommen (Todvolumen der Säule), was einen direkten Vergleich der HPLC-Spuren erschweren kann. Daher wurde den belichteten Proben in einer dritten Spur vergleichbare Mengen der entsprechenden intakten Sequenzen beigemischt. Dies ermöglichte den unmittelbaren Vergleich zur reparierten Sequenz. In der Mischung würden verschiedene Molekül-Spezies als zwei unterschiedliche Maxima erscheinen. Die Tatsache, dass in allen Mischspuren im Retentionszeit-Bereich der intakten Sequenz jeweils nur ein Maximum zu sehen ist, spricht deutlich für die Reparatur. Zum Vergleich mit der Reparatur wurde die Schädigung der intakten Sequenz GATT

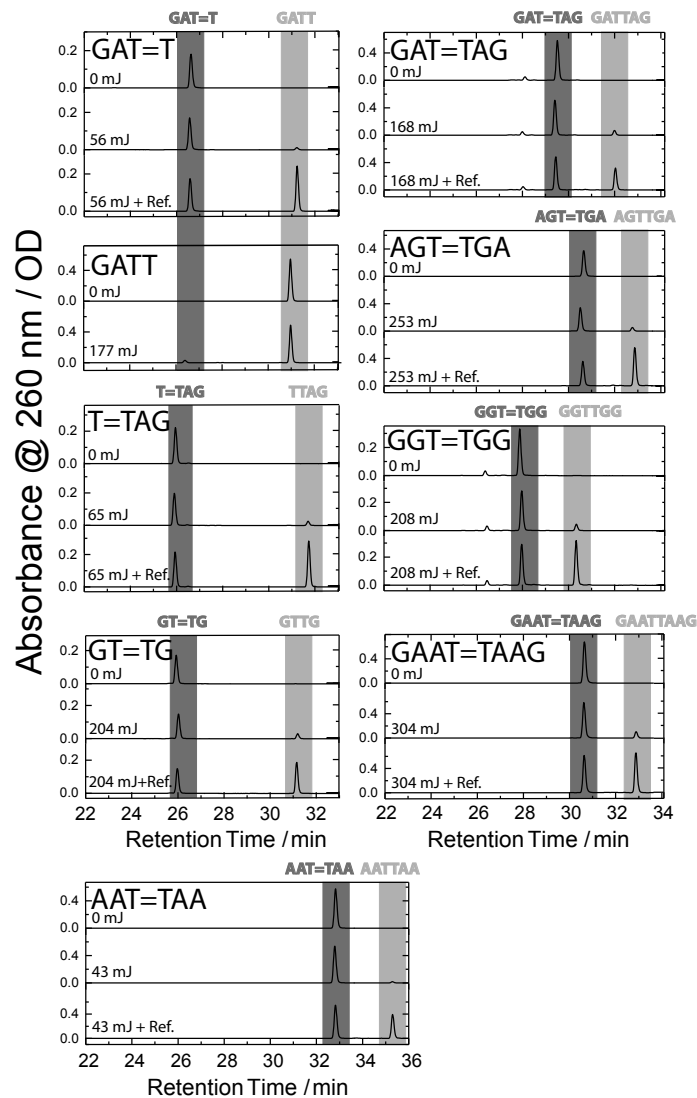


Abbildung 3.19.: Analytische HPLC-Analysen der Einzelstränge in [Abbildung 3.12](#) bei 260 nm zur Verifikation der Reparatur bzw. Schädigung. Obere Spur: Unbelichtete Probe, mittlere Spur: Belichtete Probe, untere Spur: Belichtete Probe mit beigemischter intakter Referenz. Die angegebenen Leistungen entsprechen den von den Proben absorbierten Dosen.

analysiert. Erwartungsgemäß tritt hier eine kleine Fraktion bei der Retentionszeit des CPD-geschädigten Moleküls auf. Dies unterstützt die Ergebnisse in [Abbildung 3.9](#).

Die Tetramer-Sequenzen weisen etwas geringere Retentionszeiten als die Hexa- bzw. das Oktamer auf. Der zeitliche Abstand zwischen den geschädigten und intakten Molekülen ist bei den Tetrameren überdies deutlich größer. Hintergründe könnten sein, dass die durch den T(CPD)T Schaden verursachte räumliche Strukturänderung auf kurze Sequenzen größeren Einfluss hat [[Ban09](#)]. In längeren Sequenzen ist dieser

Effekt in Relation zum Molekül geringer. Die räumliche Struktur der T(CPD)T Schäden könnte außerdem dafür verantwortlich sein, dass die geschädigten Moleküle kürzere Retentionszeiten als ihre entsprechenden intakten Sequenzen haben.

Die Reparatur der GAT=T Sequenz stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit den früheren Ergebnissen überein [Buc16]. Die intakten Basen am 3' Ende in T=TAG verursachen eine geringe Verschiebung der Maxima zu früheren Retentionszeiten. Die Retentionszeiten der Hexamere folgen der Reihenfolge GGT=TGG < GAT=TAG < AGT=TGA < AAT=TAA. Die Proben mit außenliegenden Guaninen laufen schneller und mit außenliegenden Adeninen langsamer durch die HPLC. Dies könnte daran liegen, dass Adenin ein höheres Adsorptionsverhalten gegenüber der verwendeten HPLC-Säule hat als Guanin.

Die Proben GAT=TAG und GGT=TGG weisen bereits in den unbelichteten Spuren kleine Nebenfraktionen von bis zu 10% der Hauptfraktion auf. Diese Nebenfraktionen sind auf Verunreinigungen zurückzuführen. Aufgrund der geringen Mengen wurden die Proben nicht weiter auf gereinigt. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Verunreinigungen auch einen kleinen Anteil der Belichtungsleistung bei 290 nm absorbieren. Die Berücksichtigung dieser Verunreinigungen würde in [Abbildung 3.12](#) zu höheren Steigungen führen.

Die Positionen der Maxima nacheinander gemessener Spuren sind bei den Proben AGT=TGA und GGT=TGG maximal 0.1 min zeitlich verschoben. Dies gibt einen Anhaltspunkt für die verfahrensbedingte Ungenauigkeit der Retentionszeiten. Im Rahmen dessen und durch die Mischung mit den intakten Referenzsequenzen bestätigen die HPLC Analysen die UV-induzierte CPD-Schädigung und Reparatur. Die HPLC-Analysen der Sequenzen, deren Photoprodukte sich nicht eindeutig zuordnen ließen, werden in dieser Arbeit nicht separat aufgeführt.

3.4. Mechanismus des Ladungstransfers

Als mögliche Mechanismen für die UV-induzierte Reparatur der T(CPD)T Schäden durch benachbarte Basen wurden in der Literatur Störungen des Anregungsenergie-Transfers und die Delokalisierung des angeregten Zustandes diskutiert [HIR07, Tay95, Mar05, WR96]. Der Elektronentransfer aus langlebigen ladungsgetrennten Zuständen benachbarter Dinukleotide wurde in [Buc16] vorgeschlagen. Dieser wurde daraufhin für GAT=T theoretisch untermauert [Sza18]. Ob dieser Mechanismus auch für die Reparatur der zuvor dargestellten CPD-Sequenzen verantwortlich sein kann, soll im Folgenden beleuchtet werden. Hierzu wurden die Lebensdauern ladungsgetrennter Zustände auf unterschiedlichen Dinukleotiden untersucht. Als Proben wurden verschiedene an den T(CPD)T Schaden angrenzende Dinukleotide aus [Tabelle 3.2](#) ausgewählt: Die Purin-Dinukleotide AA, GA, AG, sowie die Purin-Pyrimidin-Kombination GC. Als Messmethode wurde die in [Unterabschnitt 3.2.8](#) beschriebene TRIR-Spektroskopie eingesetzt.

Guanosin Sekundärstrukturen Zur reparierenden Sequenz GGT=TGG wurde im Rahmen der TRIR Messungen auch das zugehörige Dinukleotid GG untersucht. Die Ergebnisse wurden jedoch nicht in diese Arbeit aufgenommen, da der Verdacht besteht, dass sich in dieser Probe bei längerer Behandlung zunehmend Sekundärstrukturen bilden, welche das Ergebnis beeinflussen könnten. Einen Hinweis darauf liefern die UV/Vis-Spektren der Moleküle ([Abbildung 3.20](#)). Gegenübergestellt sind die Spektren für GG Proben unterschiedlicher Konzentrationen in deuteriertem Wasser.

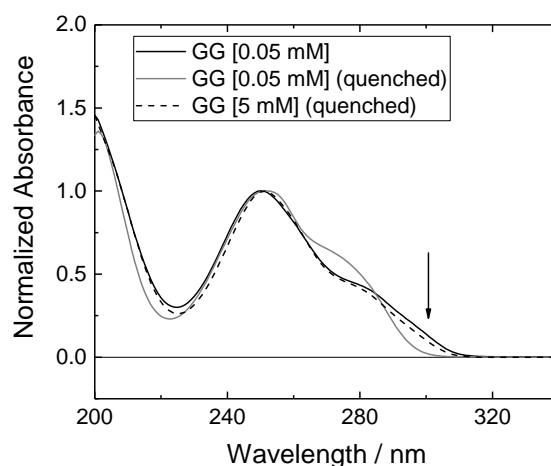


Abbildung 3.20.: Normierte UV/Vis-Spektren der Probe GG bei 0.05 mM in H_2O ohne (schwarz) und mit (grau) thermischer Abschreckung. Bei 100fach höherer Konzentration (schwarz gestrichelt) zeigt die Abschreckung praktisch keinen Effekt.

Auffällig sind das flache Absorptionsprofil der Proben und der lange Ausläufer der Flanke bei 300 nm (Pfeil). Bei niedrigen Konzentrationen von 0.05 mM ändert sich das Spektrum, wenn die Probe zuvor auf knapp unter 90°C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt wird (graue Kurve). Bei den Belichtungsmessungen betrug die Konzentration etwa 0.02 mM. Das Spektrum der abgeschreckten Probe ist vergleichbar zu den UV/Vis-Spektren der einzelnen DNA-Basen ([Abbildung 1.2](#)). Dies gibt Hinweise auf eine Strukturänderung der Probe durch die thermische Behandlung. Bei hohen Konzentrationen von 5 mM, wie sie für die TRIR-Messungen verwendet wurden, zeigt die thermische Handhabung der Probe keine Veränderung des Verhaltens (schwarz gestrichelt). Unmittelbar nach dem Auflösen der Probe in Wasser bildet sich die Flanke bei 300 nm auf einer Zeitskala von einigen Minuten aus. Die für die TRIR-Messungen erforderlichen hohen Probenkonzentrationen verursachen vermutlich eine Zusammenlagerung der Moleküle zu Sekundärstrukturen, die für den beobachteten Spektralverlauf verantwortlich sind. Dies erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Im Fall der stationären Belichtungsexperimente bei 290 nm hätte eine Aggregation eine höhere Absorbanz der Probe mit einem Maximum bei 300 nm

zur Folge. Es ist also fraglich, ob die beobachtete Negativ-Bande bei 317 nm im Differenzspektrum von GT=TG auf einen solchen Grund zurückzuführen sein kann. Bei GGT=TGG wird keine derartige Bande beobachtet, was gegen eine Aggregation bei dieser Probe spricht.

3.4.1. Auswahl des TRIR Spektralausschnitts

Die bei den TRIR Messungen zu erwartenden Radikal-Ionen können anhand der Redoxpotentiale (Tabelle 3.1) grob abgeschätzt werden. In Guanin enthaltenden Dinukleotiden ist davon auszugehen, dass G als Donator ein Elektron an die benachbarte Base abgibt. Demzufolge erscheint es sinnvoll, den Messbereich so zu wählen, dass die $G^{\bullet+}$ Markerbanden im Spektralausschnitt erfasst sind. Von den weiteren Basen sind in der Nachbarschaft von Guanin die entsprechenden Radikal-Anionen zu erwarten. Im Dinukleotid AA ist zusätzlich $A^{\bullet+}$ zu erwarten.

Entsprechend dieser Überlegungen wurden die IR-Schwingungsspektren zu den vier kanonischen DNA-Basen und ihren korrespondierenden Radikal-Kationen bzw. Anionen mit der Software *Gaussian 03* simuliert. Als Ausgangspunkt diente die Studie [Buc14a], in der außer G und A, die RNA-Base Uridin und die methylierte Base 5mC betrachtet wurden. Statt der isolierten DNA-Basen wurde in den Simulationen im Rahmen dieser Arbeit der Zucker durch eine Methylgruppe ersetzt. Dadurch wird die Bindung am N9 der Purin- und N1 der Pyrimidin-Basen berücksichtigt. Die Komplexität der Molekülstrukturen und der zugehörige Rechenaufwand werden dadurch jedoch in Grenzen gehalten.

Vergleich unterschiedlicher Simulations-Einstellungen Vor der Simulation der IR-Spektren aller vier kanonischen DNA-Basen und ihren zugehörigen Radikal-Ionen wurden am Molekül 1mC Simulationen zum Test der Einstellungen durchgeführt. Untersucht wurden die Simulationen mit unterschiedlichen Funktionalen, die Einflüsse des Lösungsmittels und die Deuterierung der Moleküle. Die Güte der Simulationsergebnisse wurde durch einen Vergleich mit experimentellen Daten überprüft [SGZ15]. Eine Gegenüberstellung findet sich in Abbildung 3.21. Die Schwingungsbanden aus den *Gaussian* Berechnungen wurden mit Hilfe des Visualisierungsprogramms *Molden 5.0* identifiziert. Die Auswertung erfolgte im Wellenzahlbereich zwischen 1400 cm^{-1} und 1850 cm^{-1} mit Lorentz-Profilen der Halbwertsbreite 5 cm^{-1} . Die Zuordnung der experimentellen Banden wurde auf Basis von [BSG03] vorgenommen. Hellgrau gekennzeichnet sind diejenigen Banden, welche einer Steckschwingung der Carbonyl (C=O) Gruppe am C2-Atom entsprechen. Dunkelgrau sind die planaren Ring-Streckschwingungsmoden markiert.

Zunächst wurden die *Becke3Lyp 6-31+G**, *6-31+G***, *6-311+G*** Funktionalen unter den Einstellungen *Opt* und *Freq = Anharmonic* miteinander verglichen. Alle Banden liegen relativ zu den experimentellen Daten zu weit im Blauen. In aufsteigender Reihenfolge verfügen die Banden über eine leichte Tendenz zu niedrigeren

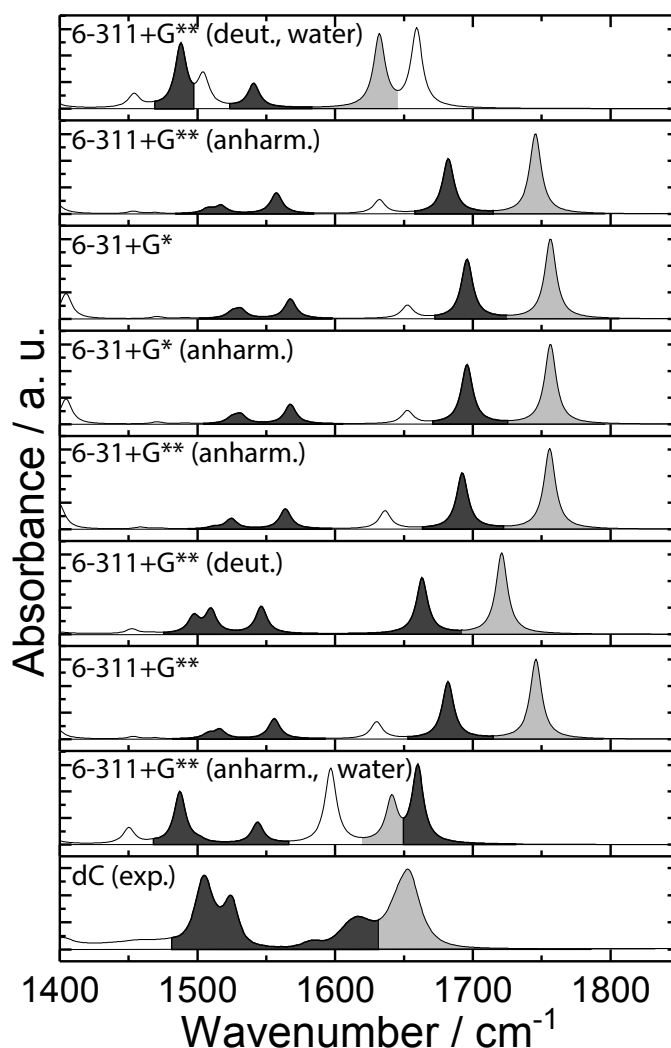


Abbildung 3.21.: Berechnete IR-Spektren für das Molekül 1mC unter Verwendung verschiedener Simulations-Einstellungen im Vergleich zu experimentellen Daten [SGZ15]. Streckschwingungen der Carbonyl-Gruppe sind hellgrau, planare Ring-Streckschwingungen dunkelgrau markiert [BSG03].

Wellenzahlen. Gleiches ist auch bei $6-31+G^*$ gegen $6-311+G^{**}$ *Opt Freq = ReadIsotopes* zu sehen. Demnach wurde für die weiteren Berechnungen das Funktional $6-311+G^{**}$ herangezogen.

Der Unterschied zwischen *Becke3Lyp 6-311+G^{**} Opt Freq = Anharmonic* und *Freq = Read Isotopes* ist minimal. Ein größerer Unterschied ergibt sich unter Beibehaltung der *Freq = Read Isotopes* Einstellung, wenn die Wasserstoffe an den Amino- und Imino-Gruppen (NH_2 - und NH -) durch Deuterium ausgetauscht werden. Dies ist im Experiment realistisch, da im Zuge der Infrarot-Spektroskopie mit deuteriertem Wasser gearbeitet wurde, worin die H-Atome an den Stickstoffen in der Größenordnung

von Millisekunden durch Deuterium substituiert werden [Sch08]. Bei Simulation des deuterierten 1mC zeigt sich eine deutliche Rotverschiebung der Schwingungsbanden im deuterierten gegenüber dem hydrierten Molekül. Somit liegen die deuterierten Spektren näher an den experimentellen Daten und werden als Einstellung weiter verwendet.

Darüber hinaus verschwindet die NH_2 Bande zwischen 1590 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} (weißes Maximum). Dieser Effekt wird besonders deutlich beim Vergleich der Einstellungen $Freq = Anharmonic$ und $Freq = Read\ Isotopes$ unter Verwendung des *PCM* Lösungsmittelmodells Wasser, wo die Bande besonders stark ausgeprägt ist. Die Berücksichtigung des Lösungsmittels gibt ihrerseits realistischere Bandenpositionen, da sie den Bedingungen im Experiment ähnlicher ist.

Resultierend aus diesen Betrachtungen wurden zur Berechnung der IR-Spektren der vier kanonischen DNA-Basen und den zugehörigen Radikal-Ionen die Einstellungen *Becke3Lyp 6-311+G** Opt Freq = Read Isotopes PCM Solvent = Water* mit deuterierten Amino- und Imino-Gruppen verwendet. Die Ergebnisse finden sich in [Abbildung 3.22](#).

Simulation der IR-Spektren Ein Vergleich mit experimentellen Spektren aus [SGZ15] (1. Diagramm in jedem Block) zeigt, dass die errechneten stationären Banden (2. Diagramm) nur grob übereinstimmen. Nichtsdestotrotz liefern die Simulationen einen Anhaltspunkt für die zu erwartenden Spektren. Die Carbonyl-Streckschwingungen liegen in allen drei Sauerstoff enthaltenden Basen G, C und T energetisch höher als die Ring-Streckschwingungen. Im Fall von Thymin existieren aufgrund der zwei im Molekül vorhandenen Sauerstoff-Atome zwei C=O Banden. Bei den Radikal-Kationen sind diese Banden weiter blau verschoben als im Grundzustand. Die Carbonyl-Banden in den Radikal-Anionen dagegen sind gegenüber dem Grundzustand rotverschoben. Eine ähnliche Tendenz in deutlich schwächerer Form zeigen die rotverschobenen Ring-Streckschwingungsbanden der Radikal-Anionen. Die Banden der Kationen liegen deutlich näher an den Grundzustands-Banden. Zusätzlich verfügen die Ring-Streckschwingungen über eine Vielzahl von Eigenmoden, was eine eindeutige Zuordnung erschwert. Die Substitution des Zuckers durch eine Methylgruppe generiert ihrerseits zusätzliche Eigenmoden der Methylgruppe, die in den Nukleotiden in dieser Form nicht entstehen können. Die meisten liegen energetisch niedriger am linken Rand der dargestellten Spektren und werden nicht näher betrachtet. Die Analyse der berechneten Spektren der vermuteten Radikal-Ionen zeigt, dass die starke C=O Bande des $G^{\bullet+}$ den hoch- und die Ring-Streckschwingungen des $A^{\bullet-}$ den niederfrequenten Spektralbereich einschränken. Der Vergleich des experimentellen Spektrums von Guanin mit dem berechneten Grundzustands-Spektrum, weist auf eine Blauverschiebung der simulierten Spektren hin. Die Carbonyl-Schwingungsbande des $G^{\bullet+}$ wird dadurch vermutlich überschätzt. Dafür sprechen die Ergebnisse von

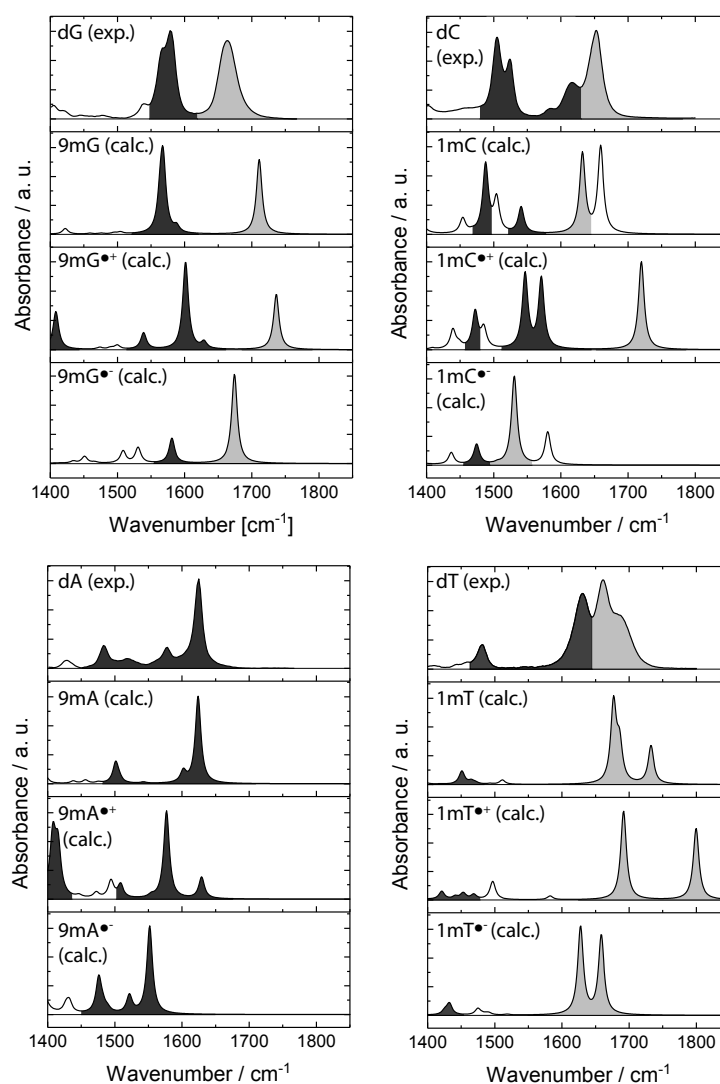


Abbildung 3.22.: Berechnete IR-Spektren der vier kanonischen DNA-Basen und die zugehörigen Radikal-Ionen im Vergleich zu experimentellen Spektren aus [SGZ15]. Am N9 der Purin- und N1 der Pyrimidin-Basen wurde der Zucker zur Vereinfachung der Berechnung durch eine Methylgruppe substituiert. C=O Streckschwingungen sind hellgrau, planare Ring-Streckschwingungen dunkelgrau gekennzeichnet [BSG03].

[Buc14a], welche die Bande bei 1704 cm^{-1} beobachtet haben. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde der Messbereich auf 1489 bis 1718 cm^{-1} festgelegt.

3.4.2. Ergebnisse der TRIR Messungen

3D Darstellung Die Datensätze der TRIR Messungen lassen sich, wie in [Abbildung 3.23](#) (oben links) am Beispiel von der Probe GA aufgezeigt, dreidimensional darstellen.

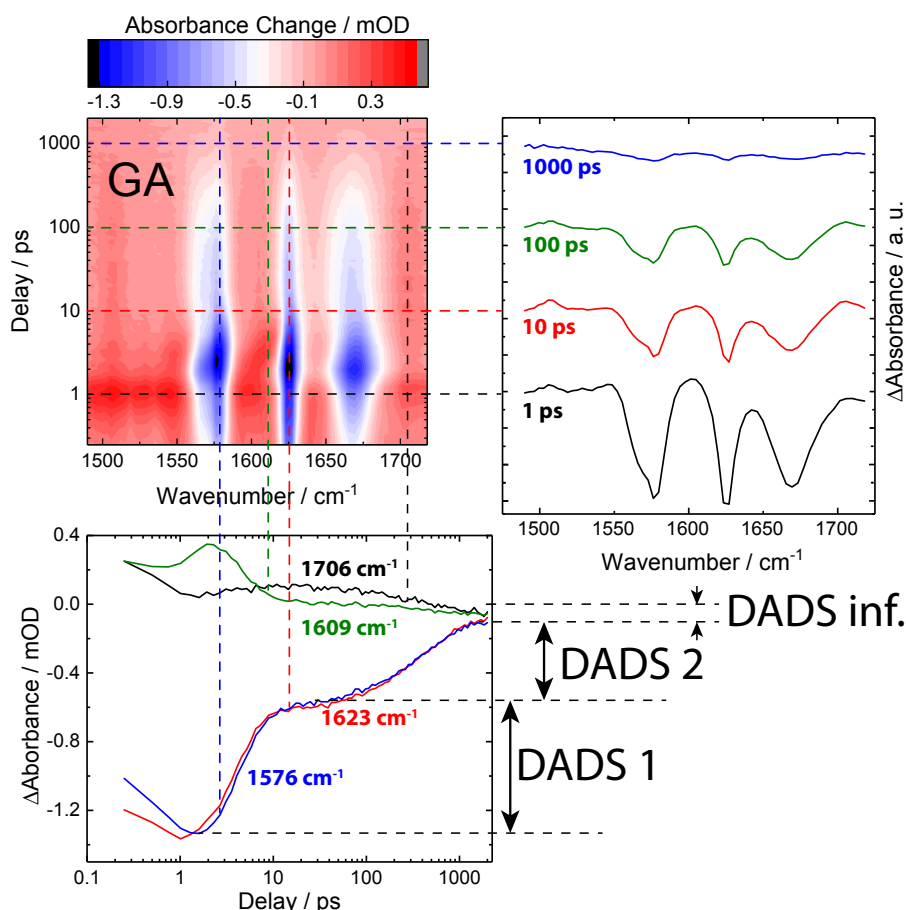


Abbildung 3.23.: 3D Darstellung der TRIR Messergebnisse von GA (oben links). Absorptionsspektren nach unterschiedlichen Verzögerungszeiten des Anregungs- gegen den Abtastimpuls (rechts). Darstellung der Zeitverläufe bei ausgewählten Markerbanden (unten).

Die Verzögerung des Anregungs- relativ zum Abtastimpuls ist gegen die Wellenzahl aufgetragen. Die durch die Anregung hervorgerufenen Absorptionsänderungen im Infraroten sind entsprechend der abgebildeten Farbskala kodiert. Die blauen Absorptionsbanden des ausbleichenden Grundzustandes treten besonders hervor. Die äußeren Banden geben den Grundzustand von Guanin und die mittlere den von Adenin wieder.

Schnitte in horizontaler Richtung stellen die Absorptionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Anregung dar (rechtes Bild). Die anfangs stark ausgeprägten

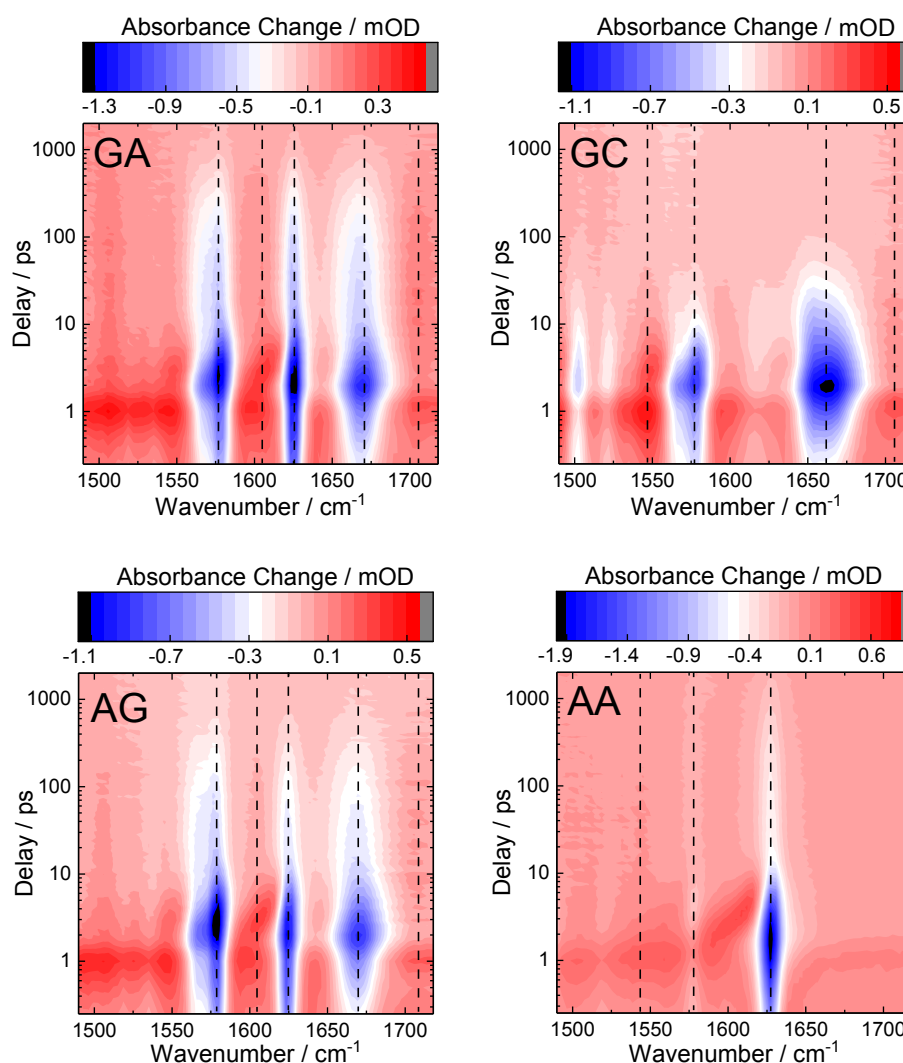


Abbildung 3.24.: 3D Darstellung der TRIR Messergebnisse unterschiedlicher Dinukleotide im Vergleich. Gestrichelte Linien markieren verschiedene Bandenpositionen ausbleichender Grundzustände (blau) und entstehender Radikal-Ionen (rot).

Absorptionsbanden des ausbleichenden Grundzustandes verschwinden hin zu längeren Verzögerungszeiten. Nach 1000 ps ist das System nicht vollständig relaxiert. Es verbleibt eine stationäre Signatur, in der sich unter anderem das Spektrum des aufgeheizten Lösungsmittels abzeichnet. Hierauf wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Die senkrechten Schnitte repräsentieren die Zeitverläufe auf logarithmischer Skala. Im unteren Bild wurden Graphen bei exemplarischen Markerbanden herausgegriffen. Die charakteristischen Ring-Streckschwingungsbanden von Guanin bei ca. 1576 cm^{-1} (blau) und Adenin bei 1623 cm^{-1} (rot) sind aufgetragen [BSG03]. Die starke Ausbleichsignatur verkörpert die initiale Anregung des Moleküls. Im

Vergleich dazu sind die Zeitverläufe bei zwei Wellenzahlen, die dem $G^{\bullet+}$ entsprechen (1609 cm^{-1} und 1706 cm^{-1}) [Buc14a], gezeigt. Der geringe Abfall der Kurven im Messfenster weist auf langlebige ladungsgetrennte Zustände hin. Die Tatsache, dass die Zeitverläufe bei langen Zeiten einen Wert kleiner null haben, basiert auf dem Effekt, dass die angeregten Moleküle einen Teil ihrer Energie an das Lösungsmittel D_2O abgeben und dieses somit erwärmen. Das heiße Lösungsmittel prägt den Daten eine eigene Signatur auf, welche im Folgenden beschrieben wird.

Abbildung 3.24 zeigt einen Vergleich der TRIR Messergebnisse unterschiedlicher Dinukleotide in dreidimensionaler Darstellung. Auffällig ist die Ähnlichkeit im Verhalten von GA und AG. Der Rückgang der Signaturen erfolgt lediglich bei AG etwas schneller als im Fall von GA. GC weist sehr kurzlebige Signaturen von Grundzustands-Ausbleichen und Radikal-Ionen auf. Dagegen verfügt die Probe AA über sehr langlebige Ausläufer der entsprechenden Signaturen.

Einflüsse des Lösungsmittels Die UV-Belichtungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit wurden in H_2O durchgeführt. Für die IR-Messungen wurden aufgrund von charakteristischen H_2O Schwingungen im untersuchten Spektralbereich als Lösungsmittel D_2O gewählt. Es besteht die Möglichkeit, dass Isotopen-Effekte Unterschiede in den transienten Zerfällen beider Lösungsmittel hervorrufen. So zeigen beispielsweise die Simulationen mit *Gaussian* (Abbildung 3.21) eine leichte Rotverschiebung der Schwingungsbanden. Unterschiede in der Stärke der Wasserstoff-Brückenbindungen könnten andere transiente Schwingungsrelaxationen hervorrufen. Am Beispiel von Adenin wurden jedoch identische transiente Signale in H_2O und D_2O beobachtet [CHK03]. Es wird daher angenommen, dass im Fall der untersuchten kurzen DNA-Sequenzen die Unterschiede zwischen den Lösungsmitteln nicht stark ins Gewicht fallen. Unabhängig davon, ist ein relativer Vergleich zwischen den TRIR-Messungen der einzelnen Proben in D_2O möglich, welcher Anhaltspunkte für das Reparaturverhalten der untersuchten Sequenzen auch in H_2O gibt.

DADS Einen quantitativen Einblick in die Lebensdauern angeregter Zustände verschaffen globale Anpassungen an die Daten, wie sie in [Sch08, Pil16] beschrieben wurden. Aus den globalen Anpassungen wurden die Zeitkonstanten für die Zerfälle und ihre korrespondierenden zerfallsbezogenen Differenzspektren (Decay Associated Difference Spectra, DADS) bestimmt. Diese sind für die oben genannten Dimere gruppenweise in Abbildung 3.25 aufgetragen. Für die Proben GA, AG und AA wurden die Anpassungen mit drei Zeitkonstanten ab 6 ps (GA), 7 ps (AG) und 7 ps (AA) durchgeführt. Für GC wurden zur näheren Differenzierung der schnellen Kinetiken 4 Zeitkonstanten ab 3 ps herangezogen. Die Bedeutung der DADS zu unterschiedlichen Zeitkonstanten werden im Folgenden näher erläutert.

Innerhalb der ersten Pikosekunden finden ultraschnelle interne Konversionsprozesse statt, gefolgt von Schwingungskühlung [BBU15b]. Dabei wird die überschüssige

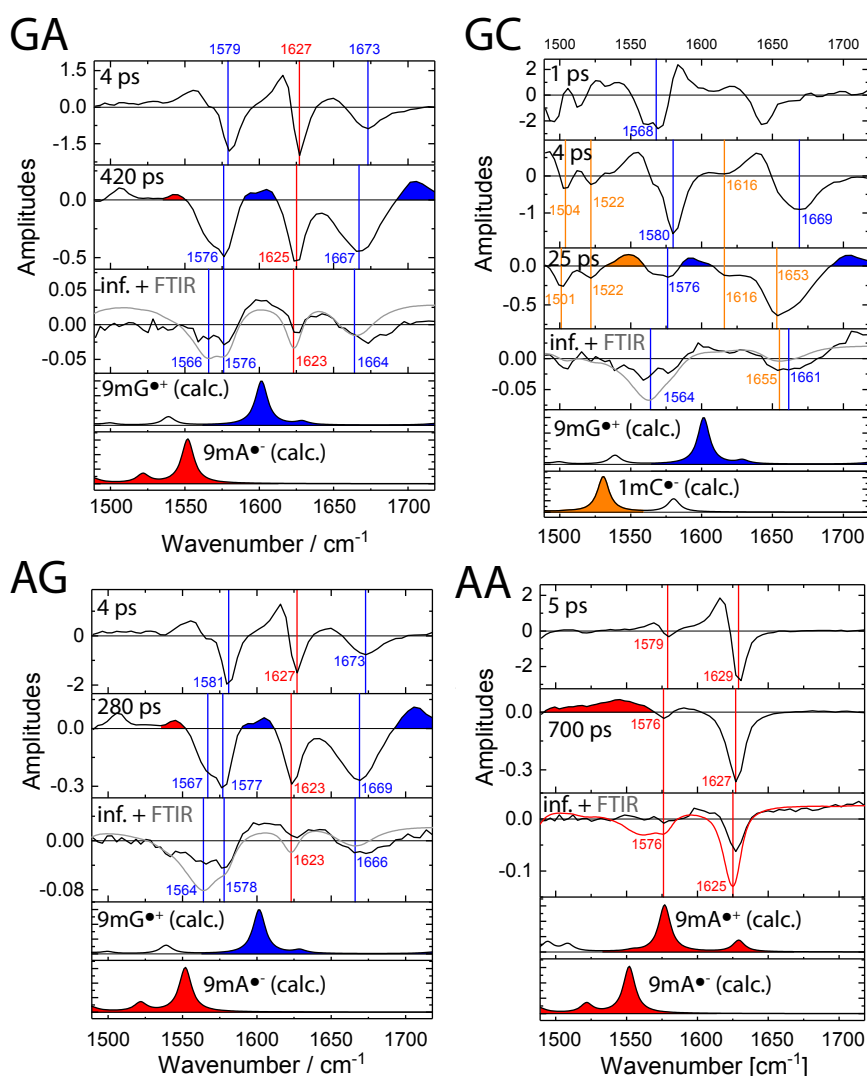


Abbildung 3.25.: DADS der Dinukleotide GA, AG, GC und AA. Bei der Komponente zur Zeitkonstante „unendlich“ wurde der Einfluss des aufgeheizten Lösungsmittels subtrahiert (vgl. [Abschnitt 3.4.2](#)) und stationäre FTIR-Spektren mit negativem Vorzeichen und angepasstem Nullpunkt (grau) hinzugefügt. Die berechneten Radikal-Ionen-Spektren sind [Abbildung 3.22](#) entnommen.

Schwingungsenergie an das Lösungsmittel abgegeben. Beispiele für die Dauer sind 3 ps für Desoxyguanosin-Monophosphat (dGMP) [[ZIK13](#)] und 4.2 ps für 9mA in deuteriertem Wasser [[MBK07](#)]. Dieser Effekt dominiert das TRIR-Messsignal innerhalb der ersten Pikosekunden und somit die DADS zu frühen Zeitkonstanten (erste Graphen in den Gruppen). Das Ausbleichen des Grundzustandes (Ground State Bleach, GSB) ist in den DADS als negative Banden bei für die DNA-Basen charakteristischen Wellenzahlen zu beobachten. Mithilfe der Literatur [[BSG03](#)] identifizierte Bandenpo-

sitionen wurden farbig markiert (senkrechte Linien) und durch ihre Wellenzahlen den entsprechenden Basen zugeordnet. Charakteristisch für die Schwingungskühlung sind positive Banden am niederfrequenten Rand der GSB Banden, welche Anharmonizität zugeschrieben werden [HOZ98, Sch04].

Angeregte elektronische Zustände sind die Ursache für die langlebigen positiven Banden in den DADS zu Zeitkonstanten zwischen ca. 10 ps und 1 ns [BBU15b, HOZ98]. Diese sind als farbige Flächen gekennzeichnet. Es handelt sich um die Signaturen ladungsgetrennter Radikalpaare der Dinukleotide. Die Identifikation der Banden erfolgte durch Vergleiche mit der Literatur [Buc14a] und mit den in [Unterabschnitt 3.4.1](#) berechneten Spektren. Letztere wurden zum expliziten Vergleich in den unteren beiden Graphen jeder Gruppe gegenüber gestellt. Die relative Lage der positiven Radikationen-Banden relativ zu den zugehörigen GSB Banden stimmen in Experiment und Simulation überein.

Zusätzlich zu den schnellen Kinetiken verbleibt bei langen Zeiten von > 1000 ps ein Teil des ursprünglichen Signals mit deutlich reduzierter Amplitude als Hintergrund erhalten (vgl. [Abbildung 3.23](#)). Es handelt sich um einen konstanten Term, in welchem Signaturen mit einer Lebensdauer von über 2 ns, wie beispielsweise irreversible Änderungen an der Probe, enthalten sind. Dazu zählt neben Molekül-Signaturen auch die langlebige Signatur heißen Lösungsmittels. Diese führt zu einer Absorptionsänderung, die im DADS zur unendlichen Zeitkonstanten zu finden ist. [Abbildung 3.26](#) zeigt diesen Beitrag der globalen Anpassung (inf. DADS) für das Dinukleotid GA als schwarze durchgezogene Kurve.

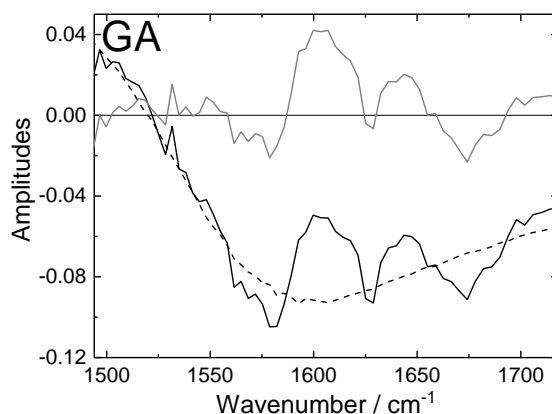


Abbildung 3.26.: Korrektur des heißen Lösungsmittels in den DADS zur Zeitkonstante unendlich. Dargestellt ist das DADS des Dinukleotids GA zur unendlichen Zerfallszeit (schwarz durchgehend), dazu skaliert die stationäre Signatur des heißen Lösungsmittels D_2O (schwarz gestrichelt) gemäß [Sch08] und das Differenzspektrum (grau).

Die Signatur für erwärmtes D_2O wurde den stationären FTIR-Spektren in (Sch08, Abb. 5.6) entnommen, entsprechend skaliert und um einen geringen Untergrund korrigiert eingezeichnet (schwarz gestrichelt). Das Differenzspektrum beider Kurven ist in grau dargestellt. Analog zu dieser Vorgehensweise wurden alle DADS zu unendlichen Zerfallszeiten in [Abbildung 3.25](#) korrigiert.

Es verbleiben Spektren der Eigenmoden des elektronischen Grundzustandes. Zum Vergleich sind zusätzlich stationäre FTIR-Spektren mit negativem Vorzeichen und angepasstem Nullpunkt in hellgrau eingezeichnet. Im Rahmen der spektralen Auflösung des verwendeten Gitters und der in [Abschnitt 3.2.8](#) beschriebenen Wellenlängenkorrektur stimmen die Positionen der Maxima überein. Einzig die Bande der Carbonyl-Streckschwingung von G bei ca. 1667 cm^{-1} ist in den DADS-Spektren relativ zu den FTIR-Daten blau verschoben. Ein Grund hierfür könnte sein, dass im Dinukleotid die Präsenz einer benachbarten Base Einfluss auf die sterische Ausrichtung der Carbonyl-Gruppe nach außen hat und die Basen eine stärker geordnete Struktur einnehmen. Laut [BSG03] verschiebt sich die Bande bei der Bildung eines räumlich geordneten Doppelstranges merklich ins Blaue. Im Fall der Dinukleotide könnte die Anordnung der Base eine ähnliche Rolle spielen.

Die Ähnlichkeit im Verhalten der Dinukleotide GA und AG spiegelt sich in ihren DADS wider. Der ladungsgetrennte (CT) Zustand von AG hat mit 280 ps eine etwa 140 ps kürzere Lebensdauer der von GA. Gründe hierfür könnten ebenfalls in der sterischen Ausrichtung der Basen liegen, wodurch unterschiedliche Stapelung hervorgerufen werden könnte. Die $G^{\bullet+}$ Banden sind in den DADS beider Proben sehr deutlich zu erkennen. Schwierig zu identifizieren sind die $A^{\bullet-}$ Banden im Bereich von unter 1550 cm^{-1} aufgrund ihrer Vielzahl unterschiedlicher Ring-Streckschwingungen.

Der CT Zustand lebt im GC Dinukleotid mit 25 ps eine Größenordnung kürzer als bei GA und AG. Die Amplituden der G-Kation Banden sind vergleichbar. Die $C^{\bullet-}$ Bande tritt sehr deutlich bei 1549 cm^{-1} hervor. TRIR-Messungen von Bucher et al. [Buc14a] am Dinukleotid 5mCG bestätigen die gemessene $C^{\bullet-}$ Bande. Die G-Bande bei 1661 cm^{-1} im DADS für unendliche Zerfallszeit ist nicht zu höheren Wellenzahlen verschoben. Eine Ursache dafür könnte in der niedrigeren Stapelungswahrscheinlichkeit von Pyrimidin- gegenüber Purin-Basen liegen [BBU15b]. Durch die ungeordnete Struktur behalten die Dinukleotide ihre freie Beweglichkeit und somit ihren Einzelbasen-Charakter.

Das AA Dinukleotid verfügt über eine starke Absorptionsbande bei ca. 1627 cm^{-1} . Diese zeichnet sich deutlich im GSB Signal aller zugehörigen DADS ab. Die Amplitude der Bande im DADS zur Zerfallszeit unendlich ist wesentlich größer als bei den anderen untersuchten Dinukleotiden. Die Lebensdauer des CT Zustandes ist mit 700 ps im Vergleich ebenfalls deutlich höher. Die positive Bande im zugehörigen DADS ist sehr breit und reicht von 1492 cm^{-1} bis 1569 cm^{-1} . Sie umfasst eine Vielzahl von Ring-Streckschwingungen. Die hohe Lebensdauer kann in der hohen Stapelungswahrscheinlichkeit für Adenine begründet liegen. Bei 25°C liegen im Fall von AA ca. 80% der Dinukleotide in gestapelter Anordnung vor [BBU15b]. Diese

steht in engem Zusammenhang mit der Bildung ladungsgetrennter Zustände [Sza18, Cre04]. Es bleibt jedoch offen, ob ein Teil der Anregungsenergie in Excimer-ähnliche Zustände übergeht, wie sie in der Literatur diskutiert werden [CCK05].

Fehler der globalen Anpassungen Die Genauigkeit der globalen Anpassungen hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Zunächst spielt die Wahl des anzupassenden Zeitbereichs eine Rolle. In [Abbildung 3.27](#) sind exemplarisch die zwei Transienten der Probe GA aufgetragen (graue Kurven) und die zugehörige Anpassung ab 6 ps (schwarze Kurven).

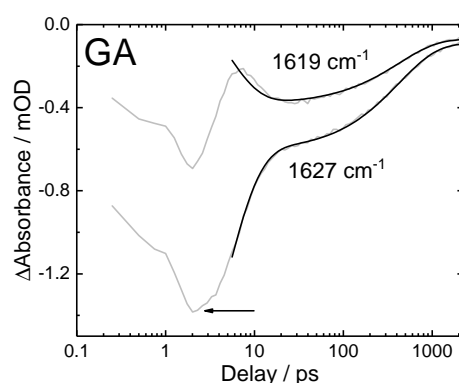


Abbildung 3.27.: Transiente Absorptionsänderung von GA bei zwei exemplarischen Wellenzahlen (grau) mit zugehöriger globaler Anpassung (schwarz). Das markierte Minimum der GSB Signatur bei 1627 cm^{-1} (Pfeil) liegt außerhalb des Anpassungsbereiches.

Es handelt sich um die Wellenzahl 1619 cm^{-1} und den GSB der A-Bande bei 1627 cm^{-1} . Letzterer Zeitverlauf wird aufgrund ihrer Kurvenform zu frühen Zeiten unter 10 ps von der globalen Anpassung nicht präzise getroffen. Dieser Effekt wird reduziert, falls die untere Anpassungs-Intervallgrenze zu längeren Zeiten verschoben wird. Je später jedoch die Anpassungsgrenze liegt, umso unpräziser werden die DADS für kurze Zeiten. GSB Minima, wie das in der Abbildung gekennzeichnete (Pfeil), können durch die Anpassung nur noch grob abgeschätzt werden und genaue Informationen über Ausbleichamplituden und Lebensdauern gehen verloren. Bei der Festlegung des Anpassungsbereiches gilt es eine Balance zu finden zwischen diesen beiden Aspekten. In den dargestellten Messungen wurden die unteren Grenzen für die Anpassungen auf 3, 6 und 7 ps gesetzt, was in allen Fällen das lokale Minimum der GSB Signatur ausschließt. Die Lebensdauern und Amplituden der frühen DADS sind daher unpräzise im Hinblick auf die Messdaten. Anders gestaltet sich die Situation für die langlebigen DADS, wo die Abweichungen der Anpassungskurven von den Daten geringer sind.

| Sample | Fit from ps | # of τ | τ_{CT} / ps | χ^2 |
|--------|-------------|-------------|------------------|----------|
| GA | 6 | 3 | 420 ± 120 | 0.44 |
| AG | 7 | 3 | 280 ± 160 | 0.44 |
| GC | 3 | 4 | 25 ± 9 | 0.35 |
| AA | 7 | 3 | 700 ± 600 | 0.32 |

Tabelle 3.5.: Lebensdauern der CT Zustände (τ_{CT}) mit Anpassungs-Einstellungen und Fehlerabschätzung aus den Anpassungsdaten.

Bessere Anpassungsergebnisse zu frühen Zeiten lassen sich durch eine globale Anpassung mit einer höheren Anzahl an Zeitkonstanten erzielen. So wurde beispielsweise im Fall von GC mit 4 anstelle von 3 Zeitkonstanten angepasst. Dadurch konnte die untere Anpassungsgrenze bei vergleichbaren Abweichungen (vgl. χ^2 in [Tabelle 3.5](#)) auf 3 anstelle von 6 ps reduziert werden. Die Einführung einer weiteren Zeitkonstante zu frühen Zerfallszeiten verringert jedoch die Abstände zwischen den Zeitkonstanten. Dies führt zu stark verfälschten DADS. Unterhalb eines Faktors von etwa 5 zwischen den Zeitkonstanten werden ähnliche Artefakte sich gegenseitig kompensierender Amplitudenspektren in den DADS beobachtet. Es gilt daher mit den Anpassungseinstellungen einen Kompromiss zwischen den genannten Punkten zu finden.

Einen Anhaltspunkt für die Abweichungen der Anpassungen liefern die zugehörigen χ^2 -Werte, welche durch das Anpassungsprogramm ausgegeben werden. Diese sind in [Tabelle 3.5](#) für die unterschiedlichen Proben aufgelistet. Die Fehler für die ermittelten Zeitkonstanten, welche in [Abbildung 3.28](#) graphisch als Fehlerbalken dargestellt sind, entsprechen den Varianzen. Im Fall des Dinukleotids AA liefert die Anpassung nur einen groben Anhaltspunkt für die Zeitkonstante, da diese mit einem sehr hohen Fehler behaftet ist. Im Rahmen dieser Ungenauigkeiten stimmen die gemessenen TRIR-Daten mit der Studie [[Buc14a](#)] überein, in welcher für die Proben GA und mCG langlebige Zeitkonstanten von 300 und 20 ps bestimmt wurden.

Ungenauigkeiten der Wellenlängen-Korrektur Neben den Ungenauigkeiten der globalen Anpassung, gibt es Ungenauigkeiten in der Wellenlängenkorrektur (vgl. [Abschnitt 3.2.8](#)). Vergleiche der stationären FTIR-Spektren mit den DADS für unendliche Zeitkonstanten liefern einen Anhaltspunkt für die Abweichungen. Auf Grundlage dessen werden diese auf bis zu 3 cm^{-1} geschätzt. Diese bewirkt eine Verschiebung der Spektren, welche die Interpretation der Daten jedoch kaum beeinträchtigt.

Abschätzung der CT Quantenausbeuten aus den TRIR-Daten

Ziel dieses Abschnitts ist es, den in [Buc16] vorgeschlagenen Mechanismus, dass CT Zustände für die Reparatur der CPD-Proben in [Abschnitt 3.3](#) verantwortlich sind, anhand der vorgestellten Ergebnisse der TRIR-Messungen zu überprüfen. In Analogie zu den in [Tabelle 3.4](#) dargestellten Schädigungs- und Reparatur-Quantenausbeuten, erscheint es daher sinnvoll, aus den TRIR-Daten eine Quantenausbeute für die Bildung des CT Zustandes abzuschätzen.

Als Maß für die von der Probe absorbierte Leistung dienen die GSB Signale der Basen abzüglich dem DADS mit unendlicher Zeitkonstante. Diese Größe entspricht der Summe der DADS mit endlichen Zeitkonstanten (vgl. [Abbildung 3.23](#) unten rechts). Die Wellenzahlen mit dem stärksten GSB wurden aus [Abbildung 3.24](#) abgelesen. Anschließend wurden in den zugehörigen Transienten die lokalen Minima bestimmt.

Die Anzahl der umgesetzten Moleküle nach (3.4) steckt implizit in den Amplituden der entstehenden Radikal-Ionen Banden. Da die Radikal-Ionen jedoch unterschiedliche Oszillatorstärken als der Grundzustand haben können, ist ein direkter Vergleich schwer. Eine einfachere Variante ist es daher, die Ausbleichbanden direkt miteinander zu vergleichen. Aufgrund thermischer Effekte können Abweichungen in den Positionen der lokalen Minima in den 3D-Darstellungen und den zu den CT-Zuständen gehörigen DADS entstehen [HOZ98, Sch04]. Im Rahmen dieser Abschätzung wurden die Zahlenwerte der nächstgelegenen lokalen Minima aus den CT DADS abgelesen. Die Verschiebung aufgrund thermischer Effekte betrug bis zu einem Detektionskanal. Für die Abschätzung der CT Quantenausbeute wurde der erhaltene Zahlenwert mit dem zuvor ermittelten GSB Wert ins Verhältnis gesetzt (siehe [Anhang A](#)). Diese Prozedur wurde für alle starken GSB Banden durchgeführt und die erhaltenen Zahlenwerte gemittelt. [Abbildung 3.28](#) veranschaulicht die gemittelten CT Quantenausbeuten.

Dabei wird davon ausgegangen, dass die langlebigen CT Zustände entweder aus der Anregung der einen oder anderen Base im Dinukleotid entstehen können. Beim Ladungstransfer geht die benachbarte Base in ein Radikal-Ion über und zeigt dieselbe Signatur auf. Bei den Proben GA, AG und GC wurden jeweils zwei $G^{\bullet+}$ und eine $A^{\bullet-}$ bzw. $C^{\bullet-}$ Bande gemittelt. Im Fall von AA wurde lediglich die Bande bei 1627 cm^{-1} ausgewertet und mit dem GSB Signal skaliert. In [Abbildung 3.28](#) ist zusätzlich die Lebensdauer aus den globalen Anpassungen dargestellt. Dieses Verfahren zur Bestimmung der Lebensdauern ist relativ ungenau und daher mit großen Fehlern behaftet. Die in der Abbildung eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den vom Anpassungsprogramm ausgegebenen Varianzen. Die aufgetragene Lebensdauer der Probe AA ist sehr ungenau und dient lediglich als grober Richtwert. Die Daten werden lediglich für einen qualitativen Vergleich der Messungen herangezogen:

Die CT Quantenausbeuten der Proben GA und AG verhalten sich ähnlich wie die Lebensdauern. Dabei liegt die CT Ausbeute für AG etwas tiefer. GC verfügt über eine ähnliche hohe Quantenausbeute wie GA, jedoch sticht die sehr niedrige Lebensdauer hervor. Am niedrigsten ist in diesem Vergleich die CT Quantenausbeute

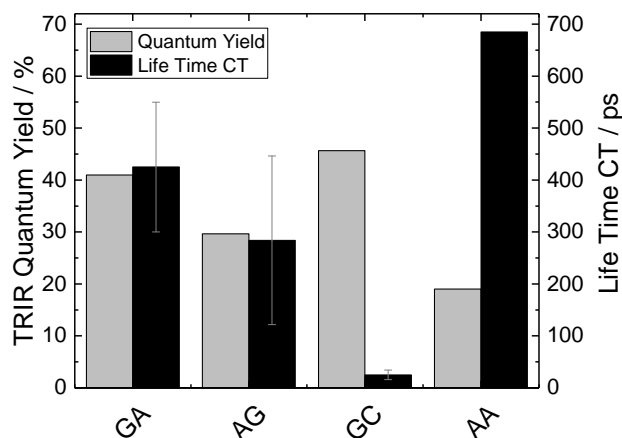


Abbildung 3.28.: Abschätzung der Quantenausbeute des CT-Zustandes aus gemittelten TRIR-Daten (graue Balken). Im Fall von AA wurde nur eine Bande ausgewertet. AA verfügt außerdem über einen hohen Fehler in der angegebenen Lebensdauer (vgl. [Tabelle 3.5](#)). Die schwarzen Balken geben die Lebensdauern der CT-Zustände aus den DADS an. Zu beachten ist die geringe Lebensdauer von GC.

der Probe AA, welche demgegenüber eine äußerst hohe Lebensdauer aufweist. Die Größenordnung der abgeschätzten Quantenausbeuten stimmt mit den angegebenen Fraktionen in [\[Buc14a\]](#) überein.

Ungenauigkeiten der CT Quantenausbeute Die Abschätzung der Quantenausbeuten der CT Zustände aus den TRIR Daten ist mit Ungenauigkeiten behaftet. Für alle angeregten DNA-Basen werden deutlich ausgeprägte GSB Banden beobachtet. Die Anfangsanregung wird gefolgt von ultraschneller interner Konversion. Diese erzeugt Moleküle im elektronischen Grundzustand mit einer anfänglichen Schwingungstemperatur in der Größenordnung von 1000 K, welche nach wenigen Pikosekunden durch Schwingungskühlung an das Lösungsmittel abgesenkt wird [\[MBK07, Zha13\]](#). Die durch die hohen Temperaturen auftretende Besetzung höherer Schwingungsniveaus verursacht eine Rotverschiebung der Absorptionsbanden [\[Sch04, HOZ98\]](#), wie am Beispiel der 1625 cm^{-1} Bande beim Dinukleotid AA im Zeitbereich zwischen 1 ps und 10 ps zu beobachten ist (vgl. [Abbildung 3.24](#)).

In der bisherigen Diskussion wurden ausschließlich CT Zustände betrachtet. Die gleichzeitige Entstehung anderer langlebiger Zustände würde die Quantenausbeute reduzieren. In der Literatur wurden keine Angaben für die Entstehung anderer langlebiger Zustände mit hohen Quantenausbeuten gefunden.

Bei den Dinukleotiden GC und GT werden die Auswertungen der TRIR-Daten durch die nahe nebeneinander liegende Carbonyl-Streck-Schwingungsbanden von G,

C und T im Wellenzahlbereich von 1650 cm^{-1} bis 1675 cm^{-1} erschwert. Im Fall von GT überlappen sich die Positivbanden des $G^{\bullet+}$ und des T-Radikal-Anions im DADS des CT-Zustandes (vgl. [Abbildung 3.25](#)). Dies ergibt zusätzliche Ungenauigkeiten bei der Auswertung.

Einflüsse des CT auf das Reparaturverhalten Zur Reparatur der dargestellten T(CPD)T Schäden tragen verschiedene Faktoren bei: Dazu zählen die Quantenausbeute und Lebensdauer der CT Zustände in engem Zusammenhang mit der Stapelungs-Wahrscheinlichkeit, die Redoxpotentiale der DNA-Basen, die Ladungsverteilung, aber auch sterische Aspekte. Die einzelnen Beiträge sind im Rahmen dieser Arbeit nur eingeschränkt zugänglich. So sind beispielsweise die zuletzt genannten Faktoren Kernpunkte theoretischer Studien. Es folgt daher nun eine qualitative Gegenüberstellung der Ergebnisse vor dem Hintergrund der genannten Beiträge.

Zu sterischen Aspekten zählen neben der räumlichen Ausrichtung auch Faktoren wie die Sequenz, die Beweglichkeit der Basen und die Zugänglichkeit funktionaler Gruppen. Anhand der Proben GAT=T und T=TAG ist zu sehen, dass die Anordnung der Nachbarbasen am 5' oder 3' Ende des T(CPD)T Schadens Einfluss auf die Reparaturaktivität hat (vgl. [Unterabschnitt 3.3.2](#)). Obwohl die Quantenausbeute und Lebensdauer des CT Zustandes ähnlich bzw. im Fall von AG sogar etwas kleiner ist, wird bei T=TAG die stärkere Reparatur beobachtet. Es wird daher vermutet, dass die räumliche Zugänglichkeit der Nachbarbasen zum T(CPD)T Schaden eine entscheidende Rolle für die Reparaturaktivität spielt.

Die Stapelung der benachbarten Basen ist eine Voraussetzung für die Reparatur [[Sza18](#), [Cre04](#)]. Dass die räumliche Anordnung der direkt benachbarten Base gegenüber dem T(CPD)T Schaden eine Rolle spielen könnte, lassen die Ergebnisse von [[Pan12](#)] vermuten. Die stärkere Reparaturaktivität von AT=T gegenüber GT=T lässt sich nicht durch die Redoxpotentiale [[PH11](#)] erklären, wonach G der stärkere Elektrendonator ist. Purin-Basen haben mit ihrer größeren hydrophoben Oberfläche eine höhere Stapelungstendenz als Pyrimidine [[BBU15b](#)]. Die höchste Tendenz wurde bei Adenin festgestellt, die schwächste bei Thymin [[BH04](#)]. Dies könnte die schwächere Reparaturaktivität von AGT=TGA gegenüber GAT=TAG unterstützen. Die lange Lebensdauer des CT Zustandes bei AAT=TAA könnte eine ähnliche Ursache haben. Die starke Reparaturaktivität der Probe resultiert als Folgeeffekt.

3.5. Zusammenfassung Selbstreparatur

Dass DNA-Basen in der Lage sind, aufgrund von UV-Absorption, einen benachbarten T(CPD)T Schaden zu reparieren, ist aus der Literatur bekannt [[Buc16](#), [Pan12](#), [CS04](#)]. Der Vorgang wird einem CT Prozess zwischen einem langlebigen ladungsgetrennten Zustand auf den benachbarten Basen und dem T=T zugeschrieben [[Buc16](#), [Sza18](#)].

Welche Systematik hinter dem Reparaturverhalten angrenzender Basen steckt, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch gezielte Variation der benachbarten Sequenzen untersucht. Dazu wurden Belichtungsexperimente mit selektiver Anregung bei 290 nm durchgeführt und mit Hilfe von UV/Vis-Spektroskopie Quantenausbeuten für die Reparatur ermittelt. Alle untersuchten Sequenzen mit Purinen in der Nachbarschaft des T(CPD)T Schadens zeigten ein netto Reparaturverhalten. Am stärksten zeichnete sich die Sequenz T=TAG aus. Die Sequenz GCT=TCG, bei der eine Kombination aus einem Purin und einem Pyrimidin an den T=T Schaden angrenzt, zeigte eine netto Schädigung.

| | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----------|-----------------------------------|
| GG (?) | AG (280 ps) | CG | TG |
| GA (420 ps) | AA (700 ps) | CA | TA (50 ps) ¹ |
| GC (25 ps) | AC | CC | TC |
| GT (14 ps) | AT (75 ps) ² | CT | TT (-) ³ |

Tabelle 3.6.: Übersicht über mögliche Dimer-Kombinationen. In der Nachbarschaft eines T(CPD)T untersuchte Dimere sind fett markiert. Lebensdauern, welche in Zusammenhang mit ladungsgetrennten Zuständen stehen könnten, sind in Klammern aufgeführt.

Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht über alle Dimer-Kombinationen aus den vier kanonischen DNA-Basen. Die Dimere, welche in der Nachbarschaft eines T(CPD)T Schadens untersucht wurden, sind fett gekennzeichnet. Die Reparatureigenschaften beschränken sich nach aktuellem Kenntnisstand auf den oberen linken Quadranten. Ergebnisse von TRIR spektroskopischen Untersuchungen gaben Hinweise auf langlebige CT Zustände der Dinukleotide in der Größenordnung einiger hundert Pikosekunden. Der untere rechte Quadrant wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht (fehlerhafte Proben). Es ist jedoch anzunehmen, dass bei allen vier Kombinationen starke zusätzliche Schädigungen auftreten werden. Bei den Purin-Pyrimidin-Kombinationen in den beiden verbleibenden Quadranten gibt es die Möglichkeit, dass das Pyrimidin, wie im Fall von GCT=TCG in direkter Nachbarschaft zum T=T liegt. Bei Reparatur eines T=T entstehen kombinatorisch drei Möglichkeiten für die Bildung eines neuen CPD Schadens, was zu einer netto Schädigung führt. Darüber hinaus spricht die

¹Pil14a

²Doo13

³Sch09, Pil16

sehr kurze Lebenszeit des CT Zustandes bei GC von ca. 25 ps gegen die effiziente Reparatur nach obigem Mechanismus.

Falls sich das Purin, wie im Fall von TAT=T, in direkter Nachbarschaft zum T=T befindet, besteht keine zusätzliche Möglichkeit für CPD Schädigung. Dennoch wurde hier keine Reparatur beobachtet [Buc16]. Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass bei den weiteren Kombinationen mit einem an den T=T Schaden angrenzenden Purin auch keine Reparatur auftreten wird. Diese Fragestellung zu beantworten, verbleibt jedoch Gegenstand möglicher Folgestudien.

Eine Ausnahme bildet das beobachtete Reparaturverhalten der Probe GT=TG, welches in Einklang mit den Ergebnissen zu den Sequenzen GT=T und T=TG steht [Pan12]. Die kurze Lebensdauer des angeregten Guanins von wenigen Pikosekunden [ZIK13], weist auf einen anderen zugrundeliegenden Mechanismus, wie beispielsweise direkte Reparatur, hin.

Im Fall der untersuchten doppelsträngigen Sequenzen wurden ausschließlich netto Schädigungen beobachtet. Es ist jedoch hervorzuheben, dass die Schädigungen gegenüber den korrespondierenden Einzelsträngen deutlich reduziert waren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Doppelstränge durch ihre Struktur die Anregungsenergie effektiver verteilen und damit sowohl die Schädigung als auch die Reparatur der Einzelstränge reduzieren. Aufgrund der höheren Komplexität konnte kein direkter Nachweis für die Interstrang-Reparatur erbracht werden.

Die Ergebnisse der TRIR spektroskopischen Untersuchungen und die daraus bestimmten Quantenausbeuten der CT Zustände geben einen Anhaltspunkt für die Reparatureigenschaften der Sequenzen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass zusätzliche Faktoren das Reparaturverhalten der Sequenzen beeinflussen. Dazu zählen Redoxpotentiale und die Sequenz der Basen, welche für die Ladungsverteilung im Strang verantwortlich sind. Außerdem spielen sterische Faktoren, wie die Beweglichkeit und die Stapelung der Basen eine wichtige Rolle.

Die vorgestellten selbstreparierenden Sequenzen, könnten aufgrund ihrer niedrigen Komplexität wichtige Funktionen im Selektionsprozess in frühen Stadien des Lebens gehabt haben. Die kurzen Sequenzen modellieren die DNA in ihren ersten Entwicklungsstufen. Die hier verwendete Belichtung am Rande des UVC-Bereiches stellt die Umweltbedingungen auf der jungen Erde nach. Für den Reparaturprozess ist die DNA dabei auf keine externen Moleküle, wie etwa Enzyme, angewiesen. Es handelt sich stattdessen um intrinsische Eigenschaften der DNA selbst.

4. 8-OxoGuanin Schadensbildung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Einflüsse benachbarter Basen auf die Reparatur eines Photoschadens untersucht. Dazu wurden Sequenzen mit einem bereits a priori vorhandenem T(CPD)T Schaden betrachtet. Neben der Selbstreparatur spielt im Rahmen der präbiotischen Selektion der Prozess der Schadensbildung eine womöglich noch größere Rolle. Ob und inwiefern benachbarte Basen in der Lage sind, die Bildung neuer Photoschäden zu beeinflussen, wird die Fragestellung im zweiten Teil dieser Arbeit sein. Ähnlich zum ersten Teil wurde zunächst der Einfluss der Nachbarbasen auf die Bildung eines spezifischen Schadens untersucht. Hierzu wurde der häufigste oxidative Schaden [Ste89], 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OxoG), ausgewählt. Darüber hinaus wurde die generelle Schadensbildung aufgrund von UVC-Strahlung an kurzen DNA-Oligonukleotiden zufälliger Sequenzen mit Hilfe eines statistischen Sequenzierverfahrens untersucht. Diese Ergebnisse werden in [Kapitel 5](#) vorgestellt.

Dieses Kapitel befasst sich mit der Bildung des oxidativen Schadens, 8-OxoG (vgl. [Abbildung 4.1](#)). Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen vorwiegend mit ionisierender Gamma- [Ber10], UVA- und UVB-Strahlung gearbeitet wurde [Sch17b], ist das Besondere an diesem Teil der Arbeit, dass mit sehr schwacher UVC-Strahlung belichtet wurde, wie sie auch im Lauf der evolutionären Entwicklungsgeschichte eine Rolle gespielt haben können. Dabei stellte sich heraus, dass benachbarte Basen einen wesentlichen Einfluss auf die Schadensbildung nehmen. Dieser wird im Folgenden herausgearbeitet. Im Anschluss wird ein möglicher Entstehungsmechanismus diskutiert.

4.1. Grundlagen

Neben CPD-Schäden, gibt es Reihe von photoinduzierten oxidativen Schäden [Cad17]. Diese treten in der Zelle ohne spezielle Sekundärstrukturen [Ban17] und mindestens eine Größenordnung seltener auf als CPD-Schäden [CDR15]. Oxidative Schäden sind epigenetisch und stellen an sich eine Gefährdung für den genetischen Code dar [FDB17]. So zum Beispiel können sie Transversionen von G nach T und somit krebserregende Mechanismen hervorrufen [Pap02]. Im Lauf der Evolution haben sich daraus aber auch wichtige regulatorische Funktionen bei der Gen-Transkription und Signal-Transduktion entwickelt [CD17]. Aufgrund dessen wurde der Entstehungsmechanismus von 8-OxoG vielfach untersucht. Bekannte Mechanismen sind in

Abbildung 4.1 gegenübergestellt.

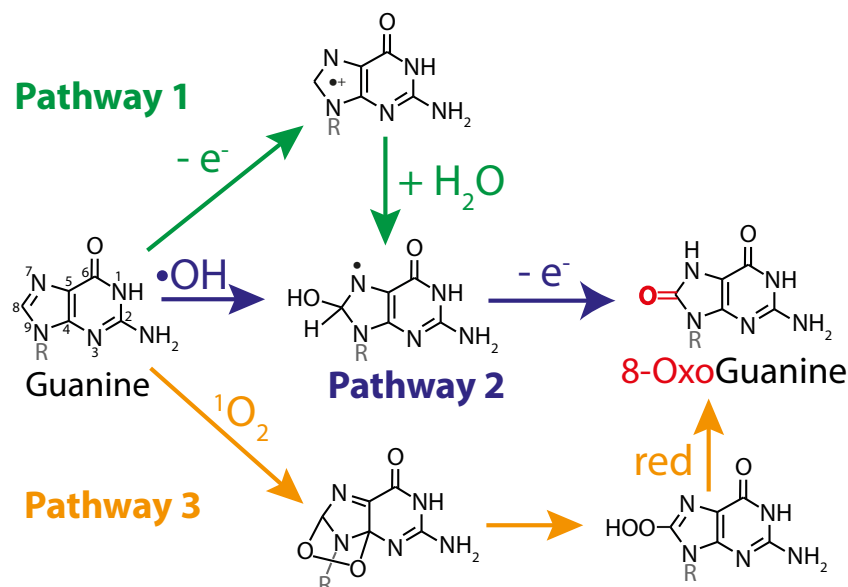


Abbildung 4.1.: Bekannte Reaktionswege für die Bildung von 8-OxoG bei UV-Einstrahlung [Cad17].

Die Reaktionswege basieren alle auf einer Wechselwirkung mit den umgebenden Molekülen zur Anlagerung des Sauerstoffes. Unterschiedlich sind die Reaktionspartner. Wo im dritten Fall ein gelöstes Singlett-Sauerstoffmolekül benötigt wird, ist es im zweiten Fall ein OH-Radikal, welches aus dem Lösungsmittel, Wasser, selbst entstehen kann. In beiden Fällen steckt die Anregungsenergie im Reaktionspartner. Anders ist die Situation beim ersten Reaktionsweg. Dieser geht von einem $G^{\bullet+}$ aus, welches in Wechselwirkung mit dem umgebenden Wasser tritt.

In bisherigen Studien zur Bildung von 8-OxoG wurde vorwiegend mit ionisierender Strahlung im UVA-, UVB- und γ -Bereich gearbeitet [CDR15, YSG17, DRC02]. Dadurch wird eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionswege für die oxidative Schädigung zugänglich. In der präbiotischen Entwicklung auf der Erdoberfläche ist von nicht ionisierender Strahlung im UV-Bereich mit spektralen Ausläufern bis in den UVC-Bereich auszugehen [Rug15]. In diesem Bereich sind photoinduzierte 1-Elektron-Ionisationsprozesse an DNA-Molekülen für die Entstehung oxidativer Schäden relevant. Die zugehörigen Mechanismen unterscheiden sich zum Teil grundlegend von den Mechanismen bei höheren Strahlungsdosen. Kürzlich wurden in einer Studie 1-Elektron-Ionisationsprozesse bei einer Wellenlänge von 266 nm an natürlicher Kalbsthymus-DNA untersucht [Gom16]. Entgegen ursprünglichen Annahmen, konnten die Autoren nachweisen, dass unter geringen Belichtungs Dosen nur Reaktionsweg 1 eingenommen wird. Offen bleibt jedoch die Fragestellung nach dem Mechanismus,

welcher zu den notwendigen Radikal-Kationen bei schwacher Strahlungsleistung führt. Diese soll im Folgenden behandelt werden.

4.2. Methode und Vorgehensweise

Natürliche DNA-Stränge, wie Kalbsthymus-DNA, stellen aufgrund ihrer Komplexität hohe Anforderungen an die Auswertung. Für Rückschlüsse auf den Mechanismus wurden daher einfache Modellsysteme in Form von Mono- und Dinukleotiden untersucht. Im späteren Verlauf wurde die Studie auf Oligonukleotide der Längen 4, 10 und 20 Basen ausgeweitet.

Probenauswahl

Zur gezielten Untersuchung der Einflüsse benachbarter Basen auf die 8-OxoG Schadensbildung wurde bei der Auswahl der zu untersuchenden Sequenzen systematisch die Nachbarschaft zum G variiert. Begonnen wurde mit der Variation der Nachbarbasen am 3' Ende: GA, GT, GC. Auf die Untersuchung von GG wurde aufgrund der schwierigen Handhabung der GG-Dinukleotide verzichtet (vgl. [Abschnitt 3.4](#)). Weitere Versuche wurden an den inversen Sequenzen AG und TG, exemplarisch für ein Purin-Purin- und ein Pyrimidin-Purin-Dinukleotid, durchgeführt. Als Referenzprobe diente Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP). Der Einfluss der Oligonukleotidlänge auf die Schadensbildung wurde mit Hilfe der Sequenzen GAAG, sowie den alternierenden GA-Sequenzen *GAGA*, $(GA)_5$, $(GA)_{10}$ untersucht.

Probenhandhabung

Die sehr geringen Quantenausbeuten der 8-OxoG Schadensbildung in der Größenordnung von 10^{-5} [[Gom16](#)] und die spontane Bildung ohne Lichtzufuhr machen eine spezielle Probenhandhabung erforderlich, da bereits kleine Verunreinigungen oder falsche Lagerung die Messergebnisse beeinflussen. Die DNA-Proben wurden kommerziell synthetisiert (*biomers.net*) und in getrocknetem Zustand geliefert. Als Lösungsmittel diente Wasser mit LC-MS Reinheitsgrad (*Merck LiChrosolv*). Verfahrensbedingt wurde dabei auf Puffer und die Zugabe von NaCl verzichtet. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 50 μM pro Base verdünnt, d. h. 25 μM bei Dimeren etc. Belichtet wurde in verschiedenen Aliquoten derselben Probe. Hierzu wurde ein Vorratsgefäß mit der gewünschten Basenkonzentration vorbereitet, aus dem für jede Messung nach vorheriger Durchmischung definierte Probenvolumina entnommen wurden. So wurden innerhalb einer Messreihe vergleichbare Probenkonzentrationen sichergestellt. Die Durchmischung wurde jeweils innerhalb von ca. 10 sec mit einem mechanischen Wirbelmischer durchgeführt. Dadurch entstandene Tröpfchen innerhalb des Reaktionsgefäßdeckels wurden durch einen sehr kurzen

Schleudervorgang in der Zentrifuge entfernt. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot der Probe für die bevorstehende Belichtung entnommen.

Zur Belichtung wurde eine Quarzküvette mit den Abmessungen (10 x 10) mm (*Hellma Analytics*) in Kombination mit einem kommerziellen (1.5 x 5) mm Magnetprüher verwendet. Die stationären Belichtungen wurden bei pH 7 durchgeführt. Durch den Verzicht auf Puffersalze verursachte Einflüsse auf den lokalen pH-Wert wurden analysebedingt im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Unmittelbar nach der Belichtung wurden die Proben in separaten Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren. Bei allen Messungen wurde sorgfältig darauf geachtet, die Zeit an Raumtemperatur für die Proben so kurz wie möglich zu halten, um eventuelle Wechselwirkungen mit der Umgebung zu minimieren. Nach der Entnahme der belichteten Proben aus der Küvette, wurde diese zweimal mit dem oben genannten spektroskopischen Wasser gespült und anschließend zweimal mit Aceton der Reinheit > 99.9% (*Merck*). Die Lösungsmittelreste wurden zunächst von Hand aus der Küvette geschleudert und anschließend gründlich mit Stickstoff herausgeblasen. Der Magnetprüher und der PTFE-Stopfen der Küvette wurden nach demselben Verfahren gereinigt. Unmittelbar nach der Reinigung wurde die Küvette verschlossen, um Staubablagerungen aus der Raumluft zu reduzieren. Die spektroskopischen Lösungsmittel wurden für die Versuchsreihen in gesonderte Vorratsgefäße gefüllt, welche ebenfalls nur jeweils kurz für die Entnahme geöffnet wurden. Durch diese Vorgehensweise konnte die vorhandenen Staubsuren auf ein Minimum reduziert werden. Zum Pipettieren der Proben wurden Pipetten der Volumina 1000 µl und 100 µl (*Eppendorf Research*) benutzt. Während der Probenpräparation und Belichtung wurden keine Zusatzmaßnahmen zum Ausschluss von Sauerstoff ergriffen.

Messmethode

Als Messaufbau wurde der in [Unterabschnitt 3.2.5](#) vorgestellte Belichtungsaufbau eingesetzt. Aufgrund der sehr geringen zu erwartenden Quantenausbeuten in der Größenordnung von 10^{-5} [[Gom16](#)] wurden die Proben mit einer Absorbanz von ca. 0.6 OD bei einer Wellenlänge von 266 nm, nahe dem Absorptionsmaximum der einzelnen DNA-Basen, angeregt. Die Spotgröße betrug ca. 5 mm x 5 mm bei einer mittleren Leistung von 1.1 mW. Die Betriebsspannung für den Magnetprüher betrug 9 V. Zu Beginn der Messreihe wurden die Belichtungsbedingungen mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Küvette kontrolliert. Die Leistung hinter der Küvette wurde im Verlauf der Messreihe protokolliert. Belichtet wurde in 4 Stufen: schwach (1 min 20 s), mittel (2 min 52 s), stark (8 min 34 s) und sehr stark (17 min 7 s). Für jede Belichtungsstufe wurden gesonderte Aliquote aus dem Vorratsgefäß entnommen. Die Quantifizierung der Menge an entstandenem 8-OxoG erfolgte durch Dr. Olesea Kosmatchev und Kerstin Kurz am Lehrstuhl Carell (Fakultät für Chemie, LMU München) mittels Ultrahochdruck-Chromatographie (UHPLC) in Kombination mit Triple Quadrupol Massenspektrometrie (QQQ-MS). Hierzu wurde den belichteten Proben zunächst

ein definiertes Testvolumen entnommen. Mit Hilfe von Verdau-Enzymen wurden die Oligomere am Rückgrat gespalten und zu Nukleosiden hydrolysiert. Diese wurden anschließend gefiltert und durch definierte Zugabe einer isotopenmarkierten 8-OxoG Referenzprobe quantifiziert. Die detaillierten Messprotokolle sind [Sch17a] zu entnehmen. Ein Vergleich der Flächen der Maxima in den zugehörigen HPLC UV-Spuren lieferte einen Wert für die restliche vorhandene Menge an intaktem G. Aus den absoluten Mengen an 8-OxoG und G wurde im Rahmen der Quantifizierung das Verhältnis der Mengen 8-OxoG / G mit zugehöriger Standardabweichung ermittelt.

Vollständigkeit des Verdaus

Ob die verwendeten Verdau-Enzyme tatsächlich die Oligomere zu Nukleosiden hydrolysierten, wurde in zwei separaten Messungen überprüft. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Abtrennung bei sehr kurzen Oligonukleotiden, wie den nachfolgend untersuchten Modellsystemen, zuverlässig funktioniert.

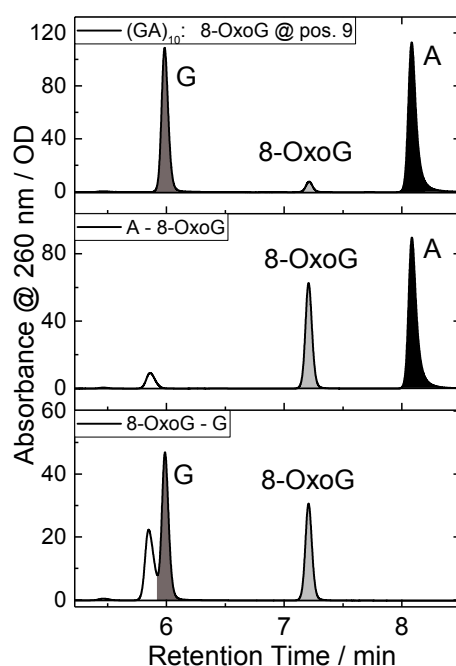


Abbildung 4.2.: Analytische HPLC Chromatogramme bei 260 nm für die synthetischen Sequenzen 8-OxoG – G, A – 8-OxoG und ein alternierendes GA-20mer mit einem 8-OxoG Baustein auf Position 9 (Synthese: *biomers.net*).

Analyse von Testsequenzen Zunächst wurden unterschiedliche Dinukleotide, sowie ein Oligonukleotid der Länge 20 Basen mit jeweils einem synthetischen 8-OxoG-Baustein erworben (*biomers.net*). Verdau und HPLC-Auftrennung wurden nach der

oben beschriebenen Methode vorgenommen. [Abbildung 4.2](#) führt die Ergebnisse für die Sequenzen 8-OxoG – G, A – 8-OxoG und ein alternierendes GA-20mer mit einem 8-OxoG Baustein auf Position 9 exemplarisch auf.

Das oberste Chromatogramm zeigt ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis zwischen der Menge an G und A im $(GA)_{10}$ Oligonukleotid und eine geringe Menge 8-OxoG bei einer Retentionszeit von 7.2 min. Dieses Ergebnis entspricht etwa der erwarteten Probenzusammensetzung. Die Dinukleotide A – 8-OxoG und 8-OxoG – G im zweiten und dritten Diagramm weisen jeweils ein höheres Maximum der intakten Base auf und einen etwas kleineres 8-OxoG Maximum. Zu beachten ist, dass die aufgetrennten Proben-Komponenten über unterschiedliche Extinktionskoeffizienten verfügen. Dieser liegt laut Hersteller für 8-OxoG bei ca. 0.5 der intakten DNA-Basen. Für einen direkten Vergleich müssen die Flächen der Maxima aufintegriert und entsprechend skaliert werden. Unter Berücksichtigung dessen stimmen die Probenmengen mit Abweichungen von ca. 30% 8-OxoG Überschuss überein. Dies lässt darauf schließen, dass die enzymatische Spaltung des Phosphat-Rückgrates nicht durch 8-OxoG beeinträchtigt wird. Die Abweichungen, wie z. B. das Maximum bei 5.85 min, lassen sich vorwiegend durch synthesebedingte Verunreinigungen der Proben erklären.

Vollständige Analyse belichteter Proben Zusätzlich zu der QQQ-MS Analyse der genannten Testsequenzen wurde die Vollständigkeit des Verdaus an belichteten Proben überprüft. Im Rahmen der QQQ-MS Analyse wurden ausschließlich spezifische Molekülfragmente von 8-OxoG quantifiziert. Eine massenspektroskopische Analyse der vollständigen Probe erforderte größere Probenmengen. Eine solche wurde an den drei Sequenzen *GA*, *GT* und $(GA)_{10}$ durchgeführt. Dazu wurden größere Stoffmengen von 140 nmol (Dimere) bzw. 14 nm (20mere) in 2 ml spektroskopischem Wasser für 1 h 35 min 51 s bei 266 nm mit einer Leistung von 1.1 mW belichtet. Anschließend wurden alle Proben verdaut und durch umfassende massenspektroskopische Untersuchungen (*Orbitrap XL*, *ThermoFisher Scientific*) analysiert. In allen drei Fällen wurden die Massen der einzelnen Basen, jedoch keine Massen der ursprünglichen Oligonukleotide gefunden. Dies gibt zusätzliche Hinweise darauf, dass der enzymatische Verdau in den untersuchten Proben vollständig abläuft. Aufgrund der geringen Probenmengen können jedoch nicht sämtliche Reaktionsprodukte routinemäßig aufgeschlüsselt werden. Dieser Sachverhalt stellt eine vermutlich kleine Fehlerquelle dar.

4.3. Ergebnisse

Die Bestimmung der UV-induzierten 8-OxoG Mengen erfolgte mit geringen Teilvolumina der belichteten Proben. Ein Vergleich der darin enthaltenen Mengen an 8-OxoG in pmol hängt stark vom gerade entnommenen Teilvolumen und somit von der Pipettier-Genauigkeit ab. Eine sinnvollere Darstellung ist der Bezug auf die im

Teilvolumen vorhandene Menge G. Diese ist erheblich größer als die Menge an 8-OxoG und ändert sich durch die Belichtung kaum. Dieses Verhältnis ist unabhängig vom analysierten Probenvolumen und dessen Konzentration. Da auch ohne Belichtung geringe Mengen an 8-OxoG in den Proben enthalten waren, wurde der 8-OxoG Anteil der unbelichteten Proben als konstanter Untergrund von allen Datenpunkten abgezogen. Der so ermittelte Anteil an entstandenem 8-OxoG wurde graphisch gegen die absorbierte Dosis aufgetragen. Letztere wurde bestimmt nach (3.6).

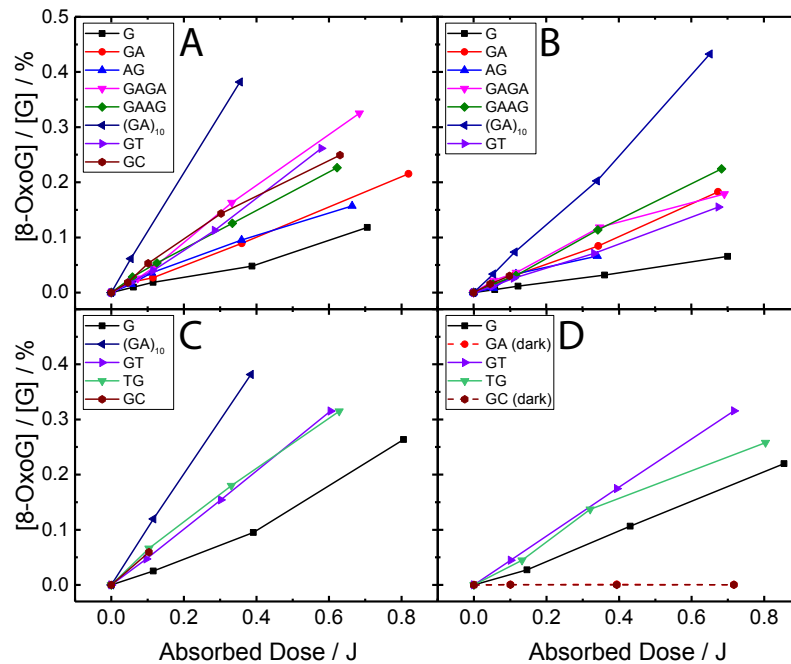


Abbildung 4.3.: 8-OxoG Schadensbildung in kurzen Oligomeren bei schwacher Belichtung mit 266 nm Licht an unterschiedlichen Messtagen. y-Achse: Relative Menge der entstandenen 8-OxoG Moleküle, $[8\text{-OxoG}]/[G]$. x-Achse: insgesamt in der Probe absorbierte Dosis, inkl. der Absorption durch nicht-G Moleküle.

Abbildung 4.3 gibt eine Gesamtübersicht der untersuchten Oligonukleotide. Die auf der x-Achse aufgetragene absorbierte Dosis bezieht sich auf die Probenmoleküle als Ganzes. Dabei wurde nicht unterschieden, welcher Anteil des Lichts von welcher Base absorbiert wurde. Hierauf wird in [Unterabschnitt 4.3.3](#) näher eingegangen. Jede Teilabbildung A bis D stellt die Daten einer Messreihe gegenüber. Innerhalb einer Messreihe wurden alle Belichtungen am selben Tag vorgenommen und an einem weiteren Tag analysiert. In jeder Messreihe treten die Proben G und GT auf. Diese dienten zusätzlich der Referenzierung.

Bei erster Betrachtung fällt auf, dass aufgrund von UVC-Belichtung im $(GA)_{10}$ Oligomer (dunkelblaue Kurven in A bis C) im Vergleich zu kürzeren Oligonukleotiden die größte Menge 8-OxoG entstanden ist. Die geringste Mengen 8-OxoG haben sich

bei den G Mononukleotiden (schwarze Kurven) gebildet. Die höhere 8-OxoG Ausbeute in Strängen im Vergleich zu Mononukleotiden steht in Einklang mit der Literatur [Pap02]. Die Graphen der Di- und Tetranukleotide liegen durchweg im Bereich, der zwischen den Kurven der Proben $(GA)_{10}$ und G aufgespannt wird.

Ob die Probenhandhabung selbst zur Bildung von 8-OxoG beitragen kann, wurde an den beiden Dimer-Sequenzen GA und GC anhand von Dunkelmessungen untersucht. Diese sind als gestrichelte Kurven in Messreihe D, im Bild unten rechts dargestellt. Die Proben wurden (unbelichtet) identisch zu den belichteten Proben behandelt. Die Datenpunkte wurden gemäß ihrer Behandlungszeit aufgetragen und dienen dem Vergleich. Die während der Prozedur unveränderte Menge an 8-OxoG lässt darauf schließen, dass die Probenhandhabung während der Belichtung die Versuchsergebnisse nicht beeinflusst.

Verfahrensbedingt sollte die vor dem Verdau zugegebene Menge an isotoopenmarkiertem 8-OxoG in etwa der zu analysierenden Stoffmenge 8-OxoG entsprechen. Vorhergehende Messreihen liefern dafür einen Anhaltspunkt. Erst die Analyse am Ende des Messvorganges gibt jedoch Aufschluss über die exakten Mengenverhältnisse. Bei sehr großen 8-OxoG Ausbeuten, wie zum Beispiel bei stark belichteten $(GA)_{10}$, lagen die Datenpunkte zum Teil oberhalb der Quantifizierungsgrenze. Diese schließt ein Mengenverhältnis zwischen der Probenmenge an 8-OxoG und dem entsprechenden isotoopenmarkierten Standard von ≤ 4.5 ein. Aufgrund des linearen Zusammenhangs der Daten, wurden in [Abbildung 4.3](#) Datenpunkte bis zu einem Mengenverhältnis (8-OxoG : isotoopenmarkiertes 8-OxoG) von 8.3 berücksichtigt.

Die Ungenauigkeit der UV-Detektion ergibt einen Fehler der absorbierten Dosis im Bereich von etwa 10% (vgl. [Abschnitt 3.3.1](#)). Diese stellt jedoch nicht den limitierenden Faktor für den Gesamtfehler dar. Die statistische Streuung der detektierten 8-OxoG Mengen liegt im Bereich von bis zu 50%. Die genauen Ursachen hierfür sind bisher nicht geklärt. Die Dunkelexperimente in [Abbildung 4.3 D](#) weisen darauf hin, dass kein zusätzliches 8-OxoG bei der Handhabung der Proben entsteht. Die verschiedenen Steigungen können entweder aus einer unterschiedlichen Photoreaktivität an den einzelnen Versuchstagen oder aus Unterschieden in der Analyse resultieren. Ein Ansatz, systematische Fehler durch Referenzierung zu eliminieren, wird in [Unterabschnitt 4.3.1](#) vorgestellt. Statistische Schwankungen zwischen Versuchsreihen lassen sich dadurch jedoch nicht korrigieren.

Folgereaktionen Die Messungen der Probe GC lieferten in den Messreihen [Abbildung 4.3 B, C](#) nur im Fall niedriger Belichtungs Dosen realistische Werte. Bei höheren Belichtungs Dosen entstehen unregelmäßige Einbrüche der 8-OxoG Mengen. Ein Beispiel ist in [Abbildung 4.4 A](#) skizziert.

Eine mögliche Ursache für einen Rückgang der Menge an 8-OxoG wäre die Photoreparatur der geschädigten Moleküle bei hohen Belichtungs Dosen. In diesem Fall müsste der Reparaturreffekt jedoch sehr ineffizient ablaufen. Wahrscheinlicher sind in

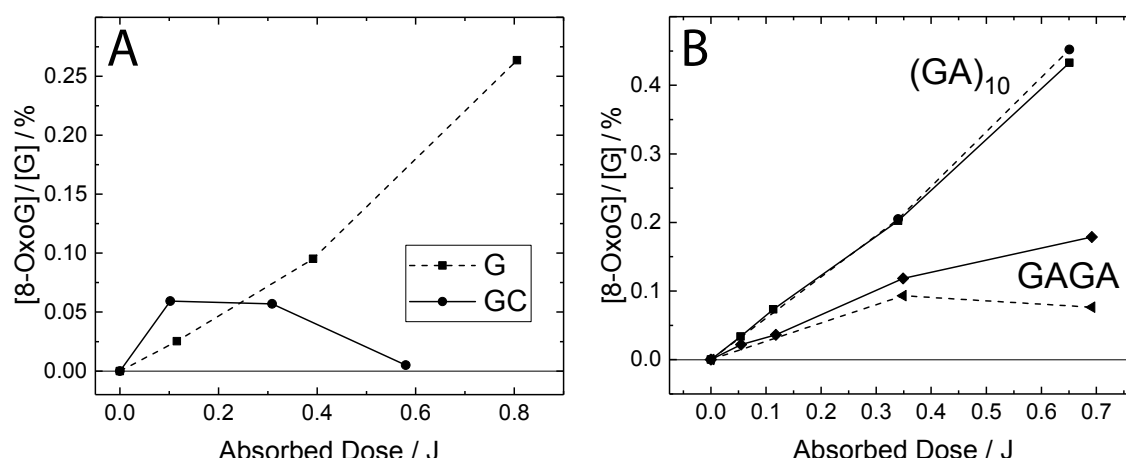


Abbildung 4.4.: Reduzierte 8-OxoG Ausbeuten bei hohen Belichtungs-dosen (A) und bei längerer Lagerung (B).

diesem Zusammenhang daher Folgereaktionen. Beispiele für mögliche Folgereaktionen finden sich in [Luo01, Fle11, Fle13, AFB15]. Im Rahmen der Messungen wurde eine vergleichbare Abnahme der 8-OxoG Menge mit steigender absorbierten Dosis häufig bei GC und selten bei AG festgestellt. In allen weiteren Fällen wurde ein näherungsweise linearer Anstieg der relativen 8-OxoG Menge mit der absorbierten Dosis beobachtet.

Dass Folgereaktionen durch lange Lagerung begünstigt werden, zeigen die Ergebnisse in [Abbildung 4.4 B](#). Aufgetragen ist ein Vergleich der Analysenergebnisse der Oligonukleotide *GAGA* und *(GA)₁₀* wenige Tage nach der Belichtung (durchgezogene Linie) und derselben Proben nach einer Lagerung von mehreren Monaten bei -20°C (gestrichelte Linie). Beim 20mer sind die Messpunkte im Rahmen der Genauigkeit reproduzierbar. Im Fall des Tetramers *GAGA* ist bei den höheren Belichtungsstufen eine deutliche Abwärtstendenz der Datenpunkte aufgrund der Lagerung zu beobachten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Proben unmittelbar nach der Belichtung bei -80°C eingefroren und wenige Tage später analysiert. Durch diese Maßnahme können Folgereaktionen zwar reduziert, aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

4.3.1. Referenzierung der Daten

Dass die Graphen der Di- und Tetranukleotide in [Abbildung 4.3](#) im Bereich zwischen den Mono- und 20-mer Kurven liegen, beschreibt das relative Verhalten der Proben zueinander. Ein direkter Vergleich der Abszissen liefert jedoch unterschiedliche Werte. Dieses Verhalten legt nahe, dass abgesehen von der Belichtung noch weitere Faktoren die Steigung der Graphen beeinflussen. Eine mögliche Ursache könnte beispielsweise in der Analyse-methode liegen, bei der bereits geringe Unterschiede im Verfahren zu

4. 8-OxoGuanin Schadensbildung

einem merklichen Effekt führen können. Zur Veranschaulichung sei der Belichtungsprozess im Folgenden kurz skizziert:

Zu Beginn seien insgesamt N^0 Guanin-Moleküle in der Probe enthalten. Diese teilen sich auf in eine Anzahl N_G^0 intakte G Moleküle und eine Anzahl N_{8-OxoG}^0 von Beginn an geschädigte 8-OxoG Moleküle.

$$N^0 = N_{8-OxoG}^0 + N_G^0 \quad (4.1)$$

Die Belichtung im UVC-Bereich wandelt mit einer Konversion γ intakte G Moleküle in 8-OxoG Moleküle um. Die Gesamtteilchenzahl N bleibt dabei erhalten.

$$N = N_{8-OxoG}^0 + \gamma \cdot N_G^0 + (1 - \gamma) \cdot N_G^0 = N^0 \quad (4.2)$$

Der zweite Summand ist der durch die Belichtung verursachte Zuwachs. Der dritte Summand ist die Anzahl der nach der Belichtung verbleibenden G Moleküle N_G . Die Summe der ersten beiden Terme verkörpert die neue Anzahl der 8-OxoG Moleküle.

Unter der Annahme, dass die sensitive QQQ-Analyse des 8-OxoG eine systematische Ungenauigkeit β in die Daten einfließen lässt, die UHPLC zur Bestimmung des G Gehaltes jedoch nicht, ergäben sich daraus folgende Analyseergebnisse vor und nach der Belichtung:

| Analysis Results | Before Illumination | After Illumination |
|------------------|----------------------------|--------------------------------|
| QQQ(8-OxoG) | $\beta \cdot N_{8-OxoG}^0$ | $\beta (N_{8-OxoG}^0 + N_G^0)$ |
| HPLC(G) | N_G^0 | $(1-\gamma) N_G^0$ |

Tabelle 4.1.: 8-OxoG Analyseergebnisse vor und nach der Belichtung.

In der Auswertung wird das Verhältnis der Menge an 8-OxoG zu G betrachtet. Dieses ist vor der Belichtung r_0 und nach der Belichtung r .

$$r_0 = \beta \cdot \frac{N_{8-OxoG}^0}{N_G^0} \quad (4.3)$$

$$r = \beta \cdot \frac{N_{8-OxoG}^0 + \gamma \cdot N_G^0}{(1 - \gamma) \cdot N_G^0} \quad (4.4)$$

Die Differenz dieser beiden Größen entspricht der Untergrund-Korrektur um die Anzahl der geschädigten 8-OxoG Moleküle, welche nicht aufgrund der Belichtung entstanden sind. Diese kann umgeformt werden zu:

$$r - r_0 = \beta \cdot \gamma \cdot \frac{N_{8-OxoG}^0 + N_G^0}{(1 - \gamma) \cdot N_G^0} \approx \beta \cdot \gamma \quad (4.5)$$

In der Näherung am Ende wurde verwendet, dass die Konversion γ sehr viel kleiner als 1 und die absolute Menge an 8-OxoG in der Probe im Vergleich zur Menge an G sehr klein ist. Hieran wird deutlich, dass Ungenauigkeiten bei der 8-OxoG Detektion die Steigungen der Kurven auf dieselbe Weise beeinflussen, wie die Ungenauigkeiten bei der Belichtung.

Als Vergleichsmethode zwischen den unterschiedlichen Messreihen erscheint daher eine Referenzierung sinnvoll. In Frage kommen hierfür die in allen Messreihen enthaltenen Graphen der Proben G und GT. Wegen der guten Aussteuerung der Messbereiche an allen Versuchstagen wurden die Messdaten der Probe GT als Bezug für die Referenzierung verwendet. Hierzu wurde die Steigungen der entsprechenden Anpassungskurven herangezogen und die Daten aller Messreihen auf diese referenziert. Auswirkungen der Referenzierung auf die Steigungen sind in [Abbildung 4.5](#) mit den ursprünglichen Steigungen der linearen Anpassungskurven gegenübergestellt. Die Reihenfolge der Balken in jeder Probengruppe entspricht von links nach rechts der Reihenfolge der Versuchstage gemäß [Tabelle 4.2](#) A bis D. Die Referenzierung reduziert bei der Mehrzahl der Proben die Streuung der Steigungen um ihren Mittelwert. Bei einzelnen Proben, G, AG und GAAG, ist allerdings auch das Gegenteil der Fall. Aus Gründen der Übersicht wird im Folgenden mit den referenzierten Daten gearbeitet.

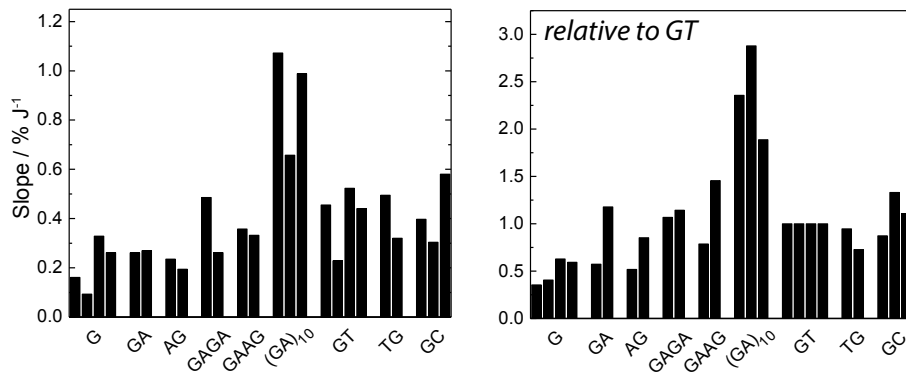


Abbildung 4.5.: Links: Steigungen der linearen Anpassungskurven zu [Abbildung 4.3](#), rechts: Auf die Steigung der Probe GT referenzierte Steigungen.

4.3.2. Quantenausbeuten

Bei geringen Belichtungs Dosen besteht ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der absorbierten Dosis und der Menge an gebildetem 8-OxoG. Für die Mono- und Dinukleotide wurden daraus die Quantenausbeuten der Schädigung entsprechend dem in [Abschnitt 3.2.6](#) beschriebenen Verfahren bestimmt. Für längere Oligonukleotide ergibt sich der Unterschied, dass jeder Strang mehrere Guanine enthält, die zu 8-OxoG umgewandelt werden können. Die Mehrfachschädigung einzelner Oligonukleotide ist jedoch aufgrund der niedrigen Belichtungs Dosen und der sehr geringen Schadensraten unwahrscheinlich. Deshalb kann in guter Näherung angenommen werden, dass alle auftretenden Strahlungs-Schäden in unterschiedlichen Oligonukleotiden sind.

Dies erlaubt ein Vorgehen, analog zu den Mono- und Dimeren, durch Bezug der Anzahl der Schäden auf die Anzahl der vorhandenen Oligonukleotide. Die Quantenausbeute entspricht hier der Anzahl umgesetzter G Basen dividiert durch die Anzahl, der in der gesamten Probe absorbierten Photonen. Die Steigung m_{8-OxoG} der Graphen in [Abbildung 4.3](#) ist direkt proportional zur dieser. Es ist aber zu beachten, dass die Abszisse auf die Anzahl der vorhandenen Guanine N_G bezogen ist. Diese muss bei der Berechnung mit berücksichtigt werden. Die Quantenausbeute ϕ_{8-OxoG} für die 8-OxoG Schädigung ergibt sich folglich zu:

$$\phi_{8-OxoG} = m_{8-OxoG} \cdot N_G \cdot E_{photon} \quad (4.6)$$

Nach dieser Vorschrift wurde die Quantenausbeute von GT aus dem Mittelwert der Steigungen der Messdaten berechnet ([Abbildung 4.5](#), links). Zur Bestimmung der weiteren Quantenausbeuten wurde dieser Wert mit den mittleren Steigungen der Proben nach der Referenzierung ([Abbildung 4.5](#), rechts) multipliziert. Eine Auflistung der nach dieser Vorschrift berechneten Quantenausbeuten befindet sich in [Tabelle 4.2](#). Als Wert für die Photonenenergie bei 266 nm wurde 4.66 eV verwendet [[Stö07](#)].

Im Fall eines Dinukleotids entspricht eine in der gesamten Probe absorbierte Leistung von 0.6 J etwa 50 absorbierten Photonen pro Molekül. Als grober Anhaltspunkt für die errechneten Quantenausbeuten sind die Studien von [[Gom16](#)] heran zu ziehen. Hier wurde die 8-OxoG Quantenausbeute bei schwachen Belichtungs Dosen (300 nm) an nativer doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA auf $5 \cdot 10^{-5}$ abgeschätzt. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelten Werte.

4.3.3. Einflüsse der benachbarten Basen

Als Hinführung auf die Kernfrage nach dem Einfluss benachbarter Basen auf die Entstehung von 8-OxoG wurden bisher die Quantenausbeuten einzelner Proben gegenüber gestellt. In diesem Abschnitt soll eine weitere Form der Darstellung ein-

| DNA Sample | $\phi_{8-OxoG} / 10^{-5}$ |
|--------------------|---------------------------|
| G | 2 ± 1 |
| GA | 4 ± 2 |
| AG | 3 ± 1 |
| GAGA | 5 ± 2 |
| GAAG | 5 ± 2 |
| GAGAGAGAGAGAGAGAGA | 11 ± 4 |
| GT | 4 ± 2 |
| TG | 4 ± 2 |
| GC | 5 ± 2 |

Tabelle 4.2.: Experimentell ermittelte Quantenausbeuten der Entstehung von 8-OxoG bei schwachen Belichtungs Dosen mit 266 nm.

geführt werden, welche die nachfolgende Betrachtung erleichtert. Dazu sei folgende hypothetische Überlegung vorweg geschickt: Betrachtet man ein G Monomer, so wird die Belichtungsleistung ausschließlich vom G selbst absorbiert. Die beobachtete Schadensbildung wird durch die in G vorliegende Anregungsenergie ausgelöst. Im Dinukleotid absorbieren beide Basen zu ähnlichen Anteilen [SGZ15]. Würde die Schadensbildung am G ohne Wechselwirkung ausschließlich durch direkt vom G absorbierte Photonen ausgelöst, lägen bei sonst gleichen Bedingungen in [Abbildung 4.3](#) für die Dinukleotide halbe Steigungen vor. Für den direkten Vergleich beider Proben bietet sich die Skalierung der x-Achse auf die in G absorbierte Dosis an. In dem skizzierten Fall ohne jegliche Einflüsse der Nachbarbase lägen die Kurven des Mono- und des Dinukleotids übereinander.

| DNA Sample | Gewichtungsfaktor G |
|----------------------|---------------------|
| G (100%) | 1 |
| G (50%) A (50%) | 0.42 |
| G (50%) T (50%) | 0.53 |
| G (50%) C (50%) | 0.56 |

Tabelle 4.3.: Übersicht der gemessenen DNA-Proben mit zugehörigen Gewichtungsfaktoren für die Errechnung der „in G absorbierten Dosis“ (nach [18g](#)).

Die in G absorbierte Dosis wurde aus der absorbierten Dosis gewichtet mit dem G-Anteil in der Probe errechnet. [Tabelle 4.3](#) zeigt die verwendeten Gewichtungsfaktoren gemäß den Extinktionskoeffizienten bei 266 nm [[18g](#)] für die unterschiedlichen Proben Zusammensetzungen.

Im realen Experiment kann sich die Anregungsenergie über die benachbarten Basen verteilen. Wechselwirkungen mit der Umgebung beeinflussen auftretende Reaktionen.

Welche Auswirkungen hat dies auf die Graphen in [Abbildung 4.3](#)? Mangels vorhandener Nachbarbasen hat der G-Monomer Graph ein Alleinstellungsmerkmal. Er wird daher als Ankergerade angedacht. Alle Manipulationen, die durch benachbarte Basen auftreten können, werden Abweichungen von dieser Ankergerade verursachen. Bei erhöhter Schadensbildung werden die Graphen steiler, bei reduzierter Schadensbildung flacher. Der G-Monomer-Graph unterteilt das Diagramm somit in zwei hypothetische Sektoren. Der obere wird der Schadensförderung durch Nachbarbasen und der untere einer Minderung der vorhandenen Schäden zugeschrieben. Die Skalierung auf die in G absorbierte Dosis ermöglicht graphisch den direkten Vergleich der 8-OxoG Entstehung aufgrund der Einflüsse der benachbarten Basen [Abbildung 4.6](#).

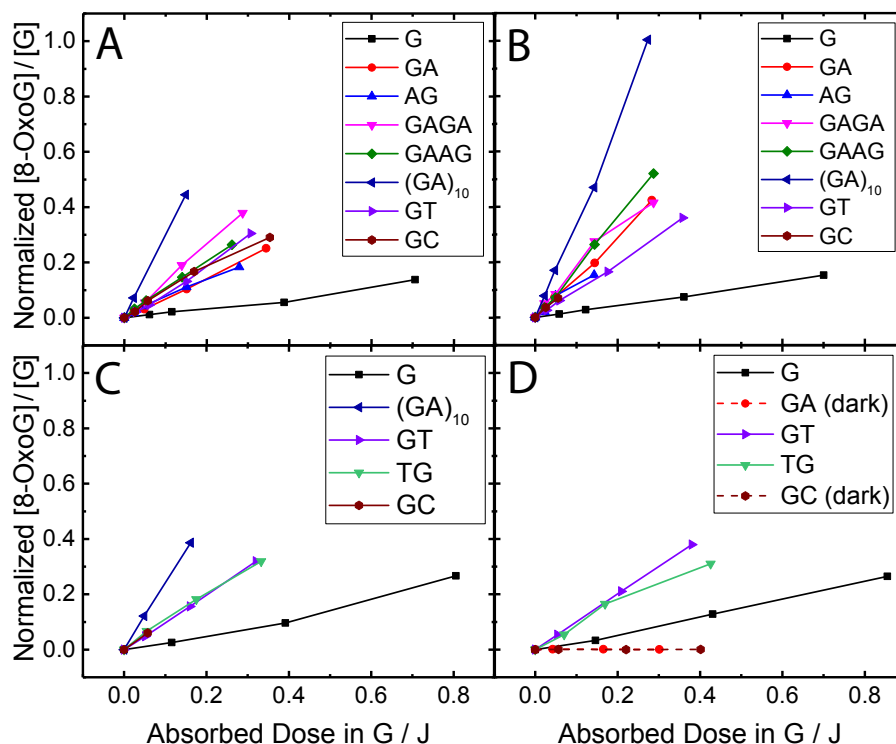


Abbildung 4.6.: Auf GT referenzierte 8-OxoG Schadensbildung in kurzen Oligomeren bei schwacher Belichtung mit 266 nm Licht an unterschiedlichen Messtagen. y-Achse: Relative Menge der entstandenen 8-OxoG Moleküle, $[8\text{-OxoG}]/[G]$, bezogen auf die Steigung der Probe GT. x-Achse: in G absorbierte Dosis gemäß [Tabelle 4.3](#).

Die 8-OxoG Schadensbildung im Mononukleotid weist einen nahezu linearen Zusammenhang mit der absorbierten Dosis auf. Alle weiteren untersuchten Proben weisen eine höhere Schädigung als G aus. Somit wirken sich die angrenzten Basen fördernd auf die oxidative Schadensbildung am G aus.

Die Graphen der vier Dimere GA, AG, GT und GC verfügen über ähnliche Steigungen. Vergleichbar mit einer etwas höheren Tendenz sind die Steigungen der

Tetramere GAGA und GAAG. Bei den eingesetzten niedrigen Belichtungsleistungen kann angenommen werden, dass zu jedem Zeitpunkt während der Belichtung im Mittel höchstens eine Photoneninteraktion pro Molekül stattfindet. Vor diesem Hintergrund können die Tetramere als Zusammensetzung von Dimeren aufgefasst werden. Unterschiede zwischen Dimeren und Tetrameren lassen sich womöglich auf die stärkere Basenstapelung der Tetramere zurückführen [BBU15b, BH04]. Viel deutlicher als in [Abbildung 4.3](#) tritt dieser Effekt beim $(GA)_{10}$ in Erscheinung. Dies gibt Hinweise darauf, dass die Basenstapelung ein wesentlicher Faktor für die Bildung von 8-OxoG in Oligonukleotiden ist.

4.4. Mechanismus der 8-OxoG Schadensbildung

Bisher ist der Entstehungsmechanismus des 8-OxoG Schadens bei niedrigen Belichtungs-dosen nicht geklärt. Ein Mechanismus unter Beteiligung von Singlett-Sauerstoff wurde in neueren Studien ausgeschlossen und stattdessen die Reaktion über ein $G^{\bullet+}$ -Zwischenprodukt vorgeschlagen [Gom16, CD18]. Die hier präsentierten Ergebnisse der langkettigen Oligonukleotide geben Hinweise darauf, dass die Basenstapelung eine wesentliche Rolle für die Bildung von 8-OxoG spielt. Da die Basenstapelung eng mit der Bildung langlebiger ladungsgetrennter Zustände verknüpft ist [CCK05, Mid09, Buc14a], wird im Folgenden durch den Vergleich mit TRIR-Messungen untersucht, ob die Schadensbildung durch langlebige ladungsgetrennte Zustände hervorgerufen werden kann.

Die Analyse durch HPLC-MS erforderte die Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen, wie etwa die Verwendung spektroskopisch reinen Wassers ohne Zugabe von Puffersalzen und NaCl. Hierdurch ergaben sich Unterschiede zwischen den stationären und den TRIR-Messungen, welche mit Puffer in deuteriertem Wasser durchgeführt wurden. Dass die transienten Schwingungsrelaxationen durch D_2O gegenüber H_2O wenig beeinträchtigt werden, wurde in [Abschnitt 3.4.2](#) angesprochen.

4.4.1. Ergebnisse der TRIR Messungen

Die Messmethode, Anpassungsprozedur, Auswertung und Fehleranalyse der TRIR-Messungen folgt der in [Kapitel 3](#) beschriebenen Methode. Einige für den Kontext notwendige Aspekte werden im Folgenden kurz wiederholt.

3D Darstellung Zusätzlich zu den in [Unterabschnitt 3.4.2](#) erläuterten Dinukleotiden, wurde das Dinukleotid GT, die beiden Tetramere GAGA und GAAG, sowie das 20mer $(GA)_{10}$ mit Hilfe von TRIR untersucht. [Abbildung 4.7](#) zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse als 3D Datensätze mit gekennzeichneten Markerbanden für GSB Signaturen und Radikal-Ionen (gestrichelte Linien).

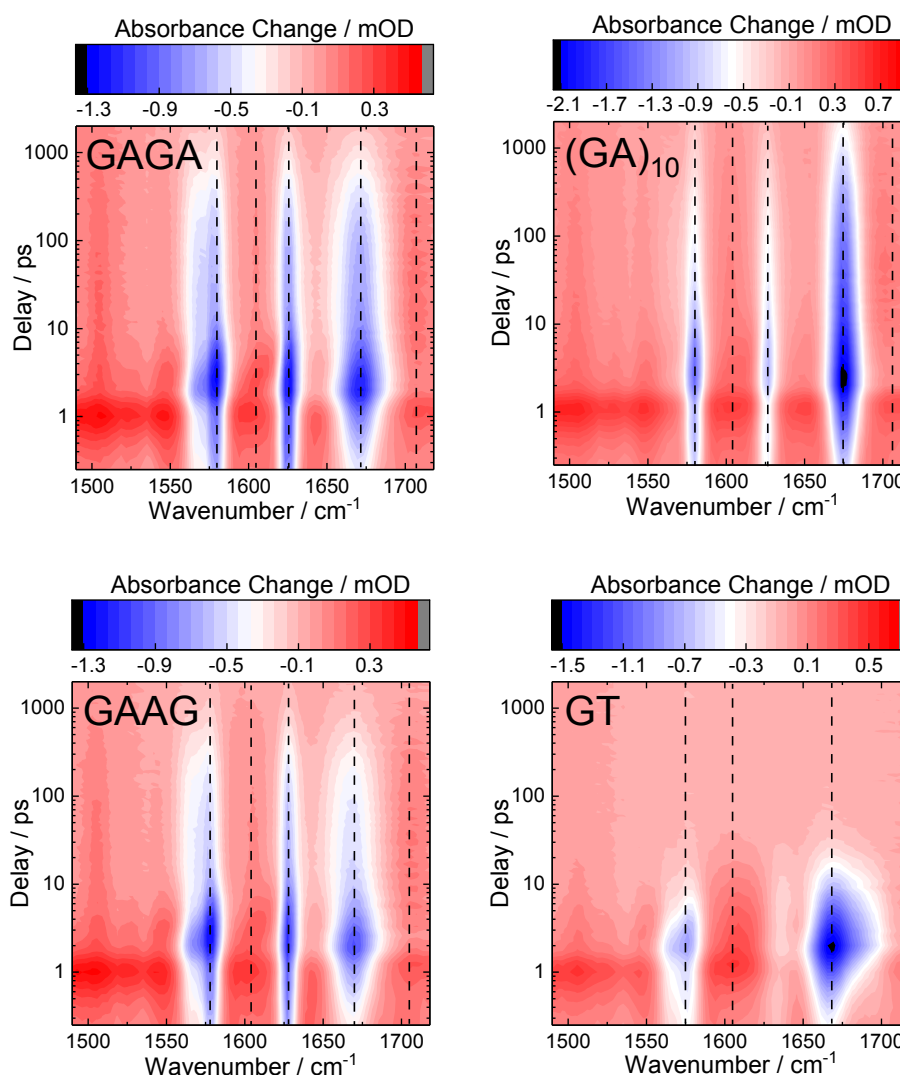


Abbildung 4.7.: 3D Darstellung der TRIR Messergebnisse unterschiedlicher Oligonukleotide im Vergleich. Gestrichelte Linien markieren verschiedene Bandenpositionen ausbleichender Grundzustände (blau) und entstehender Radikal-Ionen (rot).

Die Positionen der starken GSB Banden für G und A stimmen mit den Bandenpositionen in [Unterabschnitt 3.4.2](#) überein. Abweichungen zeigen sich lediglich bei der G Carbonyl-Bande von $(GA)_{10}$ bei 1673 cm^{-1} , welche gegenüber den anderen Proben mit Banden bei 1669 cm^{-1} etwas blau verschoben ist. Außerdem gewinnt die Carbonyl-Bande bei $(GA)_{10}$ im Vergleich zum kürzeren Tetranukleotid GAGA an Amplitude. Im Zuge der Doppelstrangbildung wird bei G eine Blauverschiebung der Carbonyl-Bande beschrieben [BSG03]. Obwohl im Fall der Probe $(GA)_{10}$ kein Komplementärstrang zur Verfügung steht, mit dem Watson-Crick-Bindungen eingegangen werden könnten, wird eine Blauverschiebung beobachtet. Ursachen hierfür könnten

sein, dass aufgrund der Basenstapelung die Anordnung der Basen zueinander ähnlich der Anordnung in einem Doppelstrang ist [Ang97], während in kurzen Einzelsträngen andere Anordnungen gefunden werden können.

Die Ähnlichkeit der TRIR Daten der beiden Tetranukleotide GAGA und GAAG erinnert an das vergleichbare Verhalten der Dinukleotide GA und AG in [Unterabschnitt 3.4.2](#). Die Daten des GT Dinukleotids haben Ähnlichkeit mit den GC Daten. Kurze Lebensdauern und überlappende GSB Banden der einzelnen Basen zählen zu den Gemeinsamkeiten.

DADS Die TRIR Daten in diesem Abschnitt wurden mit der in [Kapitel 3](#) beschriebenen globalen Anpassungs-Prozedur ausgewertet. Die zugehörigen DADS zeigt [Abbildung 4.8](#). Die identifizierten Markerbanden wurden den DNA-Basen farblich zugeordnet: G blau, A rot, T grün. In den DADS zu frühen Zeiten (oberster Graph in jeder Gruppe) sind deutlich die rotverschobenen Signaturen des Schwingungskühlprozesses zu erkennen. Die Positivbanden der langlebigen Spezies in den mittleren DADS (2. Plot je Gruppe) wurden als farbige Flächen markiert. Der Vergleich zu theoretisch errechneten Spektren der erwarteten Radikal-Ionen in den unteren beiden Graphen diente der Identifizierung. Die zugrundeliegenden theoretischen Simulationen wurden bereits in [Unterabschnitt 3.4.1](#) beschrieben. Das nach 2 ns am Ende der Messungen verbleibende Signal, wird durch die jeweils dritten DADS mit der Zeitkonstante „unendlich“ repräsentiert. Die Signatur des heißen Lösungsmittels wurde nach der Methode in [Abschnitt 3.4.2](#) abgezogen. Zum Vergleich sind die stationären IR-Spektren (FTIR) der Proben mit negativem Vorzeichen und angepasstem Nullpunkt als graue Kurven hinterlegt.

Die DADS der langlebigen Zustände zeigen für die Tetranukleotide GAGA und GAAG ähnliche Amplituden. Die G-Radikal-Kation Banden sind bei GAAG etwas stärker ausgeprägt als bei GAGA. Die Lebensdauern der CT Zustände der Tetranukleotide sind mit etwa 600 ps für GAGA und 500 ps für GAAG wesentlich höher als die der Dinukleotide GA und AG. Ein Grund hierfür könnte die stärker ausgeprägte Basenstapelung in den Tetranukleotiden sein. Das stark gestapelte AA besitzt dennoch eine höhere Lebensdauer. Betrachtet man die Sequenz GAGA zusammengesetzt aus den Teilsequenzen GA, AG und GA und die Sequenz GAAG aus GA, AA und AG, so unterscheiden sich die beiden Sequenzen kombinatorisch um den Beitrag eines GA gegen AA. Als Dinukleotid sticht AA durch seine besonders hohe Zeitkonstante der langlebigen Spezies gegenüber GA hervor. Übertragen auf die Tetranukleotide entstünde darauf basierend die Erwartung, dass GAAG über eine höhere Lebensdauer verfügen wird als GAGA. Das gegenteilige Ergebnis könnte in den Redoxpotentialen der einzelnen Basen (vgl. [Tabelle 3.1](#)) begründet liegen. G wirkt gegenüber A als Elektronendonator. Dies führt dazu, dass die zwei zentralen Adenine in GAAG als Akzeptor agieren, was eine energetisch ungünstige Konstellation hervorrufen kann. Diese könnte in Zusammenhang mit einer kürzeren Lebensdauer des CT Zustandes

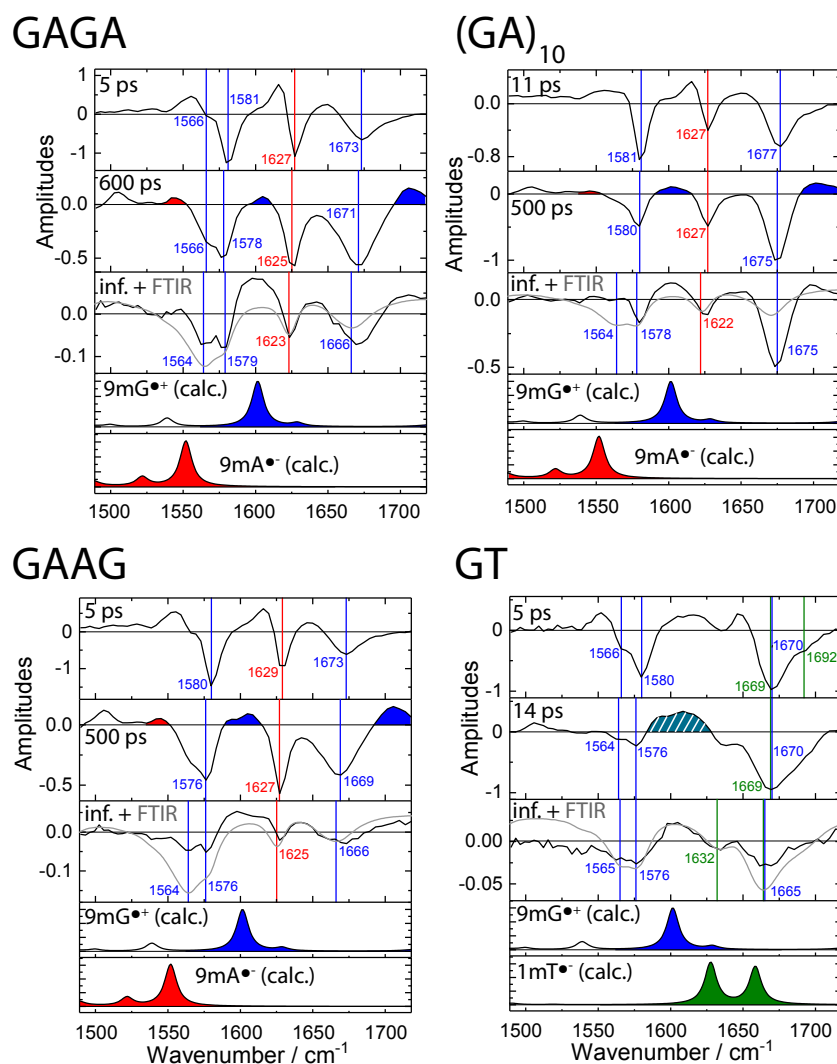


Abbildung 4.8.: DADS der Oligonukleotide GAGA, GAAG, $(GA)_{10}$ und AA. Bei der Komponente zur Zeitkonstante „unendlich“ wurde der Einfluss des aufgeheizten Lösungsmittels subtrahiert (vgl. [Abschnitt 3.4.2](#)) und stationäre FTIR-Spektren mit negativem Vorzeichen und angepasstem Nullpunkt (grau) hinzugefügt. Die berechneten Radikal-Ionen-Spektren sind [Abbildung 3.22](#) entnommen.

stehen. Die Einwirkung von G als Elektronendonator auf die Ladungsverteilung im Molekül könnte auch für die längere Lebensdauer des AA Dinukleotids gegenüber den Tetranukleotiden verantwortlich sein.

Die Banden der Radikal-Ionen haben bei der Probe $(GA)_{10}$ eine flachere Form als bei den Tetranukleotiden. Auffällig ist der verhältnismäßig starke GSB im Bereich der G Carbonyl-Streckschwingungsbande bei 1675 cm^{-1} und dessen schmaleres Spektrum. Diese könnte durch die stärkere Basenstapelung hervorgerufen werden.

Räumlich betrachtet, schwingt die Carbonyl-Gruppe senkrecht zum Rückgrat der Basen. In gestapelter Anordnung zeigt die Carbonyl-Gruppe vom Strang weg nach außen. In dieser Geometrie hat die Streckschwingung die geringsten Einflüsse durch Wechselwirkungen mit anderen Strangmolekülen, was eine Ursache für die starke Amplitude sein könnte.

Der ladungsgetrennte Zustand von GT verfügt mit 14 ps über eine relativ kurze Lebensdauer. Sowohl die GSB Banden der Carbonyl-Gruppen von G und T als auch die Signaturen der zugehörigen Radikal-Ionen überlappen sich, was die Auswertung erschwert. Die hohe und breite Positivbande im zweiten DADS wird sowohl dem G-Kation als auch dem T-Anion zugeschrieben. Da sich die Banden nicht eindeutig zuordnen lassen, wurde die Fläche in [Abbildung 4.8](#) durch eine Schraffierung gekennzeichnet.

Abschätzung der CT Quantenausbeuten aus den TRIR-Daten Die nach der in [Unterabschnitt 3.4.2](#) beschriebenen Methode abgeschätzten Quantenausbeuten für die CT Zustände sind in [Abbildung 4.9](#) aufgetragen. Als Fehlerbalken wurden die vom Anpassungsprogramm ausgegebenen Varianzen eingezeichnet. Die abgeschätzten Quantenausbeuten aus den TRIR-Daten sind im Rahmen der Fehler für alle dargestellten Proben gleich. Das Dinukleotid GT sticht durch seine geringe Lebensdauer hervor. Mit dem Verhalten besteht große Ähnlichkeit zur Probe GC. Die Lebensdauern der CT Zustände von GAGA und GAAG sind denen von $(GA)_{10}$ sehr ähnlich und stimmen im Rahmen der Ungenauigkeiten überein. Die große Ähnlichkeit in den Eigenschaften der Oligonukleotide ab 4 Basen Länge könnte in der Basenstapelung begründet liegen.

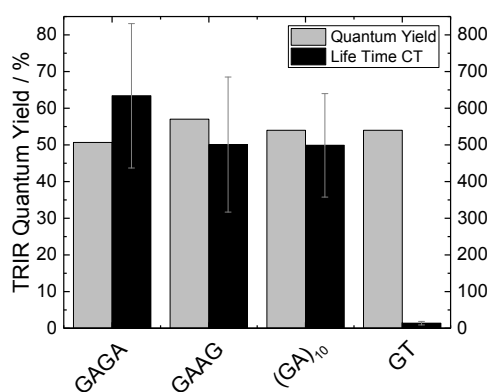


Abbildung 4.9.: Lebensdauern (schwarz) und Quantenausbeute des CT-Zustandes aus gemittelten TRIR-Daten (grau). Zu beachten ist die geringe Lebensdauer bei GT.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der globalen Anpassung, sowie den zugehörigen Ungenauigkeiten findet sich in [Tabelle 4.4](#).

| Sample | Fit from ps | # of τ | τ_{CT} / ps | χ^2 |
|--------------------|-------------|-------------|------------------|----------|
| GAGA | 6 | 3 | 600 ± 200 | 0.40 |
| GAAG | 6 | 3 | 500 ± 180 | 0.31 |
| (GA) ₁₀ | 7 | 3 | 500 ± 140 | 0.47 |
| GT | 7 | 3 | 14 ± 5 | 0.27 |

Tabelle 4.4.: Lebensdauern der CT Zustände (τ_{CT}) mit Anpassungs-Einstellungen und Fehlerabschätzung aus den Anpassungsdaten.

Zusammenhang zur Schadensbildung Die TRIR-Daten in diesem Abschnitt, sowie aus [Kapitel 3](#), lassen sich auf unterschiedliche Weise mit der Bildung des 8-OxoG Schadens vergleichen. Zwei Möglichkeiten sind in [Abbildung 4.10](#) dargestellt.

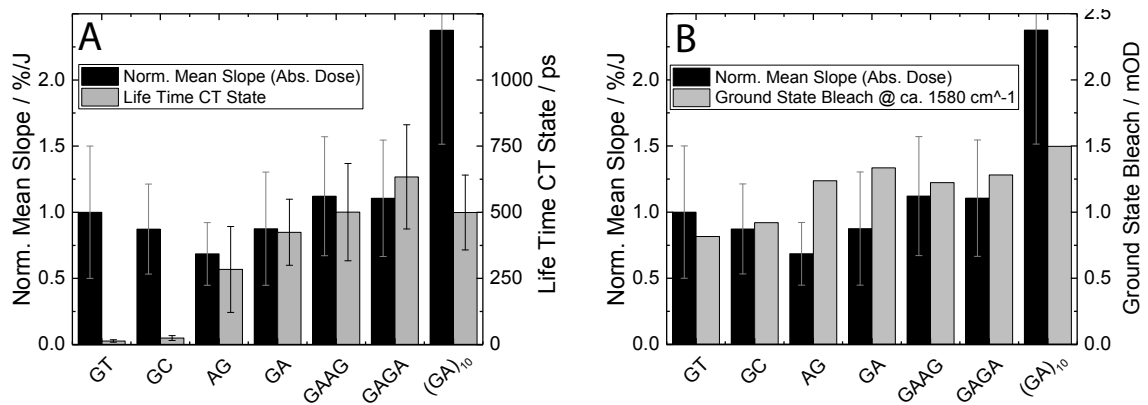


Abbildung 4.10.: Mittlere, auf GT referenzierte Steigungen der 8-OxoG Schadensbildung bezogen auf die absorbierte Dosis (schwarz). Im Vergleich dazu die TRIR Daten (grau): Lebensdauern der CT Zustände (A) und initiales Ausbleichen der G-Bande bei 1580cm^{-1} (B).

[Abbildung 4.10](#) A zeigt die Zeitkonstanten der langlebigen Zustände. Den TRIR-Daten sind die Mittelwerte der 8-OxoG Steigungen gegenübergestellt. Diese sind bezogen auf die generell absorbierte Dosis und auf die Steigung der Probe GT referenziert. Der fehlende Fehlerbalken bei GT hängt mit der Referenzierung zusammen. Bei GC erlaubt der Datensatz keine Fehlerangabe.

Bei den Purin-Dimeren und Tetrameren entsteht der Eindruck eines Zusammenhangs zwischen der Lebensdauer der ladungstrennten Zustände und der 8-OxoG Schadensbildung. Die Purin-Pyrimidin Dimere und das 20mer folgen jedoch nicht dieser Tendenz. Bei der Probe (GA)₁₀ ist die Schädigung groß, verglichen mit der Lebensdauer des CT Zustandes. Die starke Carbonyl-Streckschwingungsbande in [Abbildung 4.8](#) könnte Hinweise darauf geben, dass sich durch die stärkere Basenstapelung funktionelle Gruppen im Oligonukleotid nach außen orientieren und so die Schädigung begünstigen. Sterische Gründe könnten eine Ursache für die starke Schädigung in den längeren Oligonukleotiden sein.

Weiterhin sticht die kurze Lebensdauer der Dinukleotide GT und GC gegenüber der Schädigung hervor. Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte sein, dass die Schadensbildung, entgegen der ursprünglichen Vermutung, nicht über den ladungsgetrennten Zustand erfolgt, da andernfalls eine Korrelation mit der Lebensdauer bestünde. Falls die oxidative Schadensbildung folglich nicht über langlebige ladungsgetrennte Zustände verläuft, stellt sich die Frage nach den beteiligten Zwischenprodukten? Ein möglicher Mechanismus wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

4.4.2. Bildung von 8-OxoG über das G-Neutralradikal

Dass an der 8-OxoG Schadensbildung sehr schnelle Prozesse beteiligt sind, zeigt die kurze Lebensdauer des elektronisch angeregten Guanins von wenigen Pikosekunden [Cre04]. Die lineare Schädigung des dGMP Moleküls mit der absorbierten Strahlungsdosis (Abbildung 4.3) wird einer Ein-Photonen-Ionisation zugeschrieben [Gom16]. Bei den eingesetzten niedrigen Belichtungs Dosen wird die Schadensbildung unter Einbindung eines Singlett-Sauerstoffes (Abbildung 4.1, Reaktionsweg 3) ausgeschlossen [Gom16]. Die Bildung von Peroxylradikalen aus vorhandenem Sauerstoff ist aufgrund der verwendeten Strahlungsleistungen unwahrscheinlich [Ber10]. Infolgedessen ist die wahrscheinlichste Variante, dass der für die Bildung von 8-OxoG benötigte Sauerstoff dem Lösungsmittel entstammt. Im Fall doppelsträngiger DNA wurde dies durch isotopenmarkierte 8-OxoG Moleküle nachgewiesen [Ber10]. Die direkte Addition eines OH-Radikals ist wiederum aufgrund der niedrigen Anregungsleistungen unwahrscheinlich. Die Anlagerung von Wassermolekülen wird als Hydratisierung bezeichnet. Dieser Vorgang läuft langsam ab. Typische Zeitskalen hierfür liegen im Bereich von etwa 20 ns [Ste89]. Die Voraussetzung für einen derartigen Mechanismus wäre die Präsenz eines langlebigen Zwischenprodukts. Dessen Lebensdauer müsste die der ladungsgetrennten Zustände deutlich übersteigen.

Ein möglicher Mechanismus, der die obigen Kriterien erfüllen würde, wäre die ultraschnelle Deprotonierung des Guanins am N1-Atom (vgl. Abbildung 1.1) nach UV-induzierter Ein-Photonen-Ionisation [Ste89, Pap02]. Diese erfolgt mit einer Ratekonstante von $1.8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ [Rok14]. Daraus entsteht ein $G(-H)^{\bullet}$ Neutralradikal mit einer Lebensdauer von $\leq 100 \text{ } \mu\text{s}$ [Ste89]. Die zugehörige Schwingungsbande in D_2O bei ca. 1520 cm^{-1} [Par10] wird in den TRIR-Messungen nicht beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass nur ein sehr kleiner Anteil der ursprünglich angeregten Guanine deprotoniert werden kann. Die Hauptfraktion kehrt über ultraschnelle interne Konversion und Schwingungskühlung in den Grundzustand zurück [BBU15b] und eine kleinere Fraktion bildet ladungsgetrennte Zustände (vgl. Abbildung 4.8). Die schwachen Grundzustands-Ausbleichbanden in den DADS für unendliche Zeitkonstanten weisen jedoch auf einen geringen Anteil langlebiger Fraktionen hin, welcher in Zusammenhang mit der genannten Deprotonierung stehen könnten.

Die beobachteten Unterschiede zwischen dGMP und den Dinukleotiden könnten dadurch hervorgerufen werden, dass die benachbarte Base Einfluss auf die Elek-

tronenkonfiguration des G-Neutralradikals nimmt. Eine durch die Nachbarbasen induzierte leichte Verschiebung in Richtung der Radikal-Kationen-Konfiguration (vgl. [Abbildung 4.1](#), Reaktionsweg 1) könnte die Bildung von 8-OxoG in Dinukleotiden unterstützen. Ähnliche Kationen stabilisierende Effekte wurden bereits im Zusammenhang mit doppelsträngigen Systemen diskutiert [[Rok14](#)]. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden in neutraler Umgebung bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt. Aufgrund dessen können durch das Milieu bedingte Protonierungen der Basen weitgehend ausgeschlossen werden [[Rok14](#)].

Das ähnliche Verhalten der Dinukleotide GT, GC und GA in [Abbildung 4.10](#), gibt Hinweise darauf, dass sterische Effekte in Bezug auf den vorliegenden Mechanismus eine wichtigere Rolle spielen als die Sequenz. Die etwas niedrigere Schädigung des AG Dinukleotids gegenüber GA unterstützt diese These durch die leichtere Interaktion des G am 5' Ende (vgl. [Kapitel 3](#)). In den Tetrameren und im 20mer wird die Bildung von 8-OxoG durch Basenstapelung begünstigt [[BH04](#)]. Die ähnlichen, stärkeren Schädigungen der Tetranukleotide GAGA und GAAG und die besonders starke Schädigung des 20mers, $(GA)_{10}$, bestätigen dies.

Im vorgestellten Reaktionsmechanismus spielt die Sauerstoff-Konzentration keine Rolle. Die Messungen wurden daher nicht unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt. Tagesabhängige Unterschiede der Sauerstoff-Konzentration sind zudem wesentlich geringer als die beobachteten Schwankungen [[MCH93](#)].

Stranglänge Welcher Art der Zusammenhang der Schadensbildung mit der Oligonukleotidlänge ist, wurde mit Hilfe einer separaten Probe untersucht. Hierzu wurde ein 10mer aus alternierenden G und A Basen, $(GA)_5$, synthetisiert (*biomers.net*) und unter gleichen Bedingungen belichtet ([Abbildung 4.11](#)).

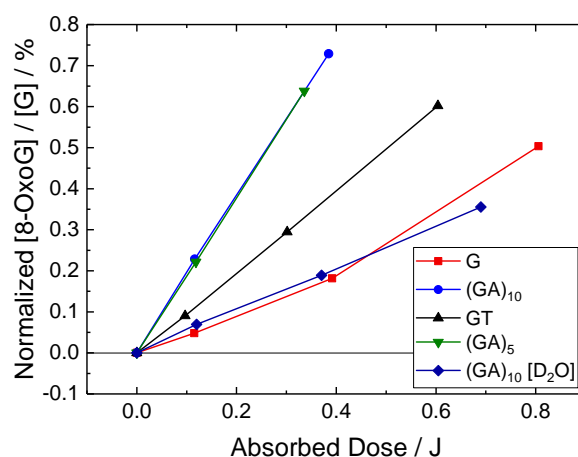


Abbildung 4.11.: Auf die Steigung von GT referenzierte 8-OxoG Schadensbildung unterschiedlicher Oligonukleotide.

Entgegen der intuitiven Annahme, die Schädigung des 10mers wäre im Bereich zwischen der des 20mers und der Tetranukleotide anzusiedeln, liegen die Kurven des 10mers und 20mers nahezu deckungsgleich. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit sterischen Argumenten. In den Dinukleotiden verfügen die Basen über eine hohe Beweglichkeit [SB17]. Dabei könnten einige Konstellationen eingenommen werden, in welchen die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel durch eine Abschirmung der reaktiven Gruppen durch die Nachbarbase reduziert werden kann. Durch die Präsenz benachbarter Nukleotide wird die Beweglichkeit der einzelnen Basen eingeschränkt. Eine mögliche Ursache für das beobachtete Verhalten könnte sein, dass ab einem gewissen Schwellenwert eine weitere Verlängerung der Sequenzen die sterischen Eigenschaften der beteiligten Basen nicht mehr wesentlich ändert.

Protonen-Transfer Ein weiteres Indiz für die 8-OxoG Bildung aufgrund einer Hydratisierung mit den Lösungsmittel-Molekülen liefern Experimente in deuteriertem Wasser. Hierzu wurde die Probe $(GA)_{10}$ unter gleichen Messbedingungen einmal in H_2O und D_2O belichtet. Die Ergebnisse sind ebenfalls in [Abbildung 4.11](#) gegenübergestellt. Die Belichtung in D_2O führt zu erheblich geringeren 8-OxoG Schäden als in H_2O . Durch die Deuterierung werden Protonen-Austausch-Prozesse verlangsamt [Kar13, Kli03]. Dies könnte die beobachtete reduzierte Schädigung hervorrufen.

D_2O hat außerdem die Eigenschaft die Lebensdauer von Singlett-Sauerstoff in Lösung zu erhöhen [Gom16]. Es kann daher als Lösungsmittel eingesetzt werden, um Reaktionsweg 3 in [Abbildung 4.1](#) zu verifizieren. Bei einem Reaktionsmechanismus, welcher die Beteiligung von Singlett-Sauerstoff einschließt, erhöht die Verwendung von D_2O als Lösungsmittel folglich die Produktausbeute. Bei niedrigen Belichtungs Dosen wurde jedoch keine erhöhte 8-OxoG Menge festgestellt [Gom16]. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene reduzierte Ausbeute an 8-OxoG, spricht gegen einen Singlett-Sauerstoff Mechanismus. Es sei jedoch erwähnt, dass es sich hierbei um die Resultate einer einzigen Messreihe handelt. Gleiches gilt für die Messung der Probe $(GA)_5$, da die Messungen ergänzend zu den ursprünglich konzipierten Experimenten durchgeführt wurden. Eine zuverlässige Validierung würde Wiederholungsmessungen erfordern.

Triplett In den bisherigen Betrachtungen wurde davon ausgegangen, dass die Reaktion nicht über die Bildung von Singlett-Sauerstoff verläuft ([Abbildung 4.1](#), Reaktionsweg 3). Das vordergründige Argument hierfür ist, dass bei den eingesetzten niedrigen Belichtungs Dosen weder Sauerstoff direkt noch durch Sensitizing in signifikantem Ausmaß angeregt wird. Die Voraussetzung dafür wäre die Anregung eines Triplett-Zustandes.

Ob es auch möglich ist, die Bildung von 8-OxoG bei geringen Belichtungs Dosen über einen Triplett-Mechanismus auszulösen, wurde mit Hilfe eines Zusatzexperimentes untersucht. Hierzu wurde ein Dinukleotid aus der modifizierten DNA-Base 4-Thio-Thymin und G synthetisiert (*biomers.net*). Die Substitution des Sauerstoff-

fes am C4-Atom des Thymins durch ein Schwefel-Atom ruft ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 336 nm hervor, welches eine selektive Anregung ermöglicht (Abbildung 4.12 A). Bei einer Wellenlänge von 355 nm verfügt 4-ThioT über eine Triplett-Quantenausbeute von 1.0 ± 0.1 [Har07]. Bei dieser Wellenlänge wurde das Dinukleotid 4-ThioTG belichtet. Im Vergleich dazu wurde das unmodifizierte Dinukleotid TG bei 266 nm unter vergleichbaren Versuchsbedingungen belichtet. Abbildung 4.12 B zeigt eine Gegenüberstellung der 8-OxoG Schadensbildung.

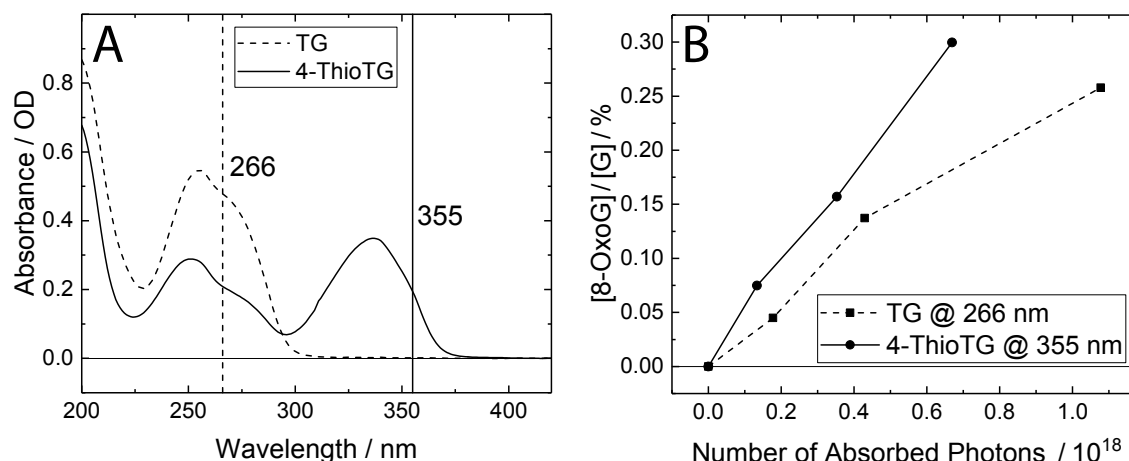


Abbildung 4.12.: Untergrund korrigierte Absorptionsspektren (A) und UV-induzierte 8-OxoG Bildung (B) der Dinukleotide TG und 4-ThioTG.

Die absorbierte Dosis beider Proben wurde auf die Anzahl absorbiert Photonen in jeder Probe umgerechnet. Unter der Annahme, dass jedes absorbierte Photon pro Molekül eine Reaktion auslösen kann, lassen sich die beiden Anregungswellenlängen durch diese Auftragung leichter vergleichen. Die Daten zeigen im Fall des Dinukleotids 4-ThioTG eine merklich höhere Schädigung als bei der korrespondierenden kanonischen Sequenz. Die selektive Anregung des 4-ThioT führt dazu, dass kein 8-OxoG durch eine direkte Anregung des G entstehen kann. Die Triplett-Energie des 4-ThioT beträgt 242 kJ/mol [Har07], die des GMP 325 kJ/mol [MCH93]. Folglich ist ein Übertrag der Triplett Energie zwischen den Basen nur von G in Richtung 4-ThioT möglich. Angeregte Triplett-Zustände haben im Fall kanonischer DNA-Basen lange Lebensdauern, typischerweise in der Größenordnung einiger Nanosekunden [Pil14b]. Eine mögliche Erklärung für die auftretende Schädigung ist die Abgabe der Triplett-Energie an den umgebenden Sauerstoff [MCH93], wodurch Reaktionsweg 3 in Abbildung 4.1 eingeleitet werden kann. Folglich würde die hohe Triplett-Anregung von 4-ThioTG bereits bei schwachen Belichtungs Dosen zur Bildung von 8-OxoG führen.

Im Fall der 266 nm Anregung des TG Dinukleotids, werden beide Basen zu ähnlichen Teilen angeregt. Die Triplett Quantenausbeute von T beträgt bei 266 nm etwa 1.3% [Ban12, Liu16b] und ist etwa eine Größenordnung höher als die von G [Mor90].

Die verglichen mit 4-ThioT ca. 2 Größenordnungen kleinere Triplett-Quantenausbeute bei vergleichbarer Schädigung suggeriert, dass der in TG ablaufende Mechanismus nicht durch Triplett-Anregung dominiert wird. Dies unterstützt die These, dass die oxidative Schadensbildung kanonischer Basen bei niedrigen Belichtungs Dosen nicht über Singlett-Sauerstoff (Reaktionsweg 3) stattfindet [Gom16].

5. Schadensbildung an statistischen Sequenzen

Ein Szenario, welches in unseren Augen der präbiotischen Entwicklung nahe kommen könnte, ist die zufällige Zusammenlagerung vorhandener Nukleotide zu kurzen DNA-Sequenzen. Die Umweltbedingungen bieten einen geringen Schutz vor eintreffender UVC-Strahlung, welcher die DNA ausgesetzt ist [RWS17]. Dies verursacht eine Vielzahl unterschiedlicher Photoschäden in diversen unterschiedlichen Sequenzen. Welchen Einfluss die benachbarten Basen im geschilderten Szenario auf die Schadensbildung haben, ist die zentrale Frage dieses Kapitels. Hierzu wurde eine ähnliche Situation im Labor nachgestellt. Eine Mischung zufälliger kurzer DNA-Oligonukleotide wurde im UVC-Bereich belichtet und sequenziert. Die Kern-Idee bestand in der Kombination eines technologisch neuen, breiten, parallelisierten Sequenzierverfahrens (Bridge Amplification) mit der Analyse kurzer statistischer Oligonukleotide. Die Ideen zu den hier dargestellten Experimenten und deren Auswertung sind in erster Linie in gemeinsamen Diskussionen mit Prof. Dr. Wolfgang Zinth im Rahmen der Kooperation mit Dr. Christof B. Mast (Lehrstuhl Braun, Physik, LMU München) entstanden. Für seine beratende Tätigkeit geht besonderer Dank an Dr. Dominik B. Bucher (Harvard, Origins of Life Initiative). Alle Belichtungsexperimente wurden im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen. Die Sequenzierung erfolgte durch Dr. Stefan Krebs (Genzentrum, München). Die Auswertung der Daten und die Implementierung der Ideen erfolgte durch Dr. Christof B. Mast. Ein wesentlicher Anteil des Projektbeitrages bestand in der Erarbeitung der Methodik, welche deshalb detaillierter geschildert wird. Als Ergebnisse werden aus einer komplexen Datenauswertung Teile exemplarisch herausgegriffen, welche einen Bezug zum ersten Teil dieser Arbeit haben.

5.1. Sequencing by Synthesis

Sequenzierungsmethoden bildeten seit der Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein mächtiges Hilfsmittel in der DNA-Forschung [Mul94]. Techniken werden laufend weiterentwickelt, was im Gebiet *Sequencing by Synthesis* die Methode der *Bridge-Amplification* hervorgebracht hat [AK94]. Einer der wichtigsten Vorteile dieses Verfahrens ist die massive Parallelität bei der Sequenzierung, wodurch einige hundert Millionen Sequenzen gleichzeitig vervielfältigt und ausgelesen werden können [18c].

Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich unter [18c]. Im Folgenden werden lediglich die für diese Arbeit relevanten Punkte hervorgehoben.

Die Arbeitsweise des *Sequencing by Synthesis* erfolgt in vier Schritten: Probenpräparation, Cluster Generation, Sequenzierung und Datenanalyse. Zunächst werden die zu untersuchenden Sequenzen an beiden Enden mit Index- und Adaptersequenzen versehen. Die ersteren dienen der Identifizierung der betreffenden Probe und mit Hilfe von letzterer hybridisieren die Proben an zweierlei Sorten fest verankerter Komplementärstränge auf einer *Flow Cell*. Die vorderen und hinteren Adaptersequenzen sind so konzipiert, dass die DNA-Stränge Brücken zwischen den verankerten Komplementärsequenzen bilden können (*Bridge Amplification*). Durch etliche isothermische Amplifikationsschritte bilden sich simultan lokale Kolonien aus den betreffenden Sequenzen. Die Replikation erfolgt dabei enzymatisch durch DNA-Polymerase. Der Ausleseprozess erfolgt zunächst explizit entlang des Vorwärts und im Anschluss separat entlang des Rückwärtsstranges mit Hilfe von Schutzgruppen bis zu einer gewünschten Auslese-Länge. Zum Auslesen werden fluoreszenzmarkierte Bausteine angefügt und nach dem Einbau durch Fluoreszenzlicht identifiziert (*Sequencing by Synthesis*). Ein Signal-to-Noise Wert des detektierten Signals liefert ein Gütekriterium für die Identifikation von jedem Cluster. Proben- und Index-Sequenzen werden separat ausgelesen. Die verfahrenseigene Datenanalyse ordnet die Index-Sequenzen den entsprechenden Proben zu und kombiniert ggf. die Resultate von vorwärts und rückwärts Reads.

Derzeit wird das Verfahren der Bridge-Amplification vielfach genutzt, um Genome zu sequenzieren [Hu15]. Für die Untersuchung kurzer Sequenzen wurden in der Analyse eigens Zusatzsequenzen eingebaut, um eine für die Brückenbildung erforderliche Mindeststranglänge zu erreichen. Die Verwendung einer High-Fidelity-Polymerase bei der Replikation verkörperte den für diese Arbeit erforderlichen Schlüssel zur Identifikation geschädigter Sequenzen. Mit den Grundannahmen, dass geschädigte Sequenzen von der Polymerase nicht repliziert werden, ungeschädigte Sequenzen jedoch alle im gleichen Ausmaß, wurden die Experimente vorbereitet.

5.2. Konzeption der Experimente

Auswahl der Randsequenzen Der Auswahl der Proben liegen einige Überlegungen zu Grunde, welche kurz vorgestellt werden sollen. Mit dem Ziel, eine möglichst breite Statistik über auftretende Photoschäden zu erhalten, wurden kurze DNA-Sequenzen vorgegebener Länge in Betracht gezogen. Die Sequenzen innerhalb einer Probe sollten einer statistischen Verteilung folgen. In einer derartigen Probe besteht die Möglichkeit, dass manche Sequenzen auf ihre Komplementärsequenzen treffen und Doppelstränge formen. Doppelsträngige Strukturen verlieren bei kurzer Oligonukleotidlänge und steigender Temperatur an Stabilität (vgl. [Abbildung 3.14](#)). Dagegen sinkt mit kürzeren Sequenzlängen die kombinatorisch mögliche Anzahl der

Sequenzen und die Wahrscheinlichkeit für ein Zusammentreffen mit einem passenden Komplementärstrang steigt. Um bei einem potentiellen Zusammentreffen die Wahrscheinlichkeit für eine Watson-Crick Bindung zu reduzieren, wurden zusätzliche Randsequenzen konzipiert. Diese sollten paarweise inkomplementär sein und bei UV-Belichtung selbst wenig Photoschädigung davontragen. Vergleiche mit aus der Literatur bekannten Photoschäden (vgl. [Kapitel 2](#)), ergaben Randsequenzen der Gestalt ACAC, welche beidseitig an den zu untersuchenden statistischen Sequenzen ergänzt wurden. Im Beispiel eines statistisch verteilten Tetramers lieferte dies Sequenzen nach dem Muster ACAC NNNN ACAC, wobei N für eine beliebige kanonische DNA-Base steht. Dass die Proben bei Raumtemperatur einzelsträngig vorlagen, ergaben simulierte und experimentelle Schmelzkurven von Dr. Christof B. Mast (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den Index-Sequenzen wurde im Replikationsverfahren eine Adapter-Sequenz eingesetzt. Mit dieser wurden die untersuchten kurzen Oligomere verlängert, um eine gewisse Mindestlänge zum Umklappen und für die Hybridisierung zu erreichen. Diese Sequenz war für alle Stränge eines Messdurchlaufes identisch und wurde zwischen den Index-Sequenzen an die Proben angefügt. Auftretende Fehlbindungen oder Abbruch-Fragmente der Adapter-Sequenz erschwerten die Zuordnung rein statistischer Sequenzen ohne ACAC-Randsequenzen. Vor diesem Hintergrund dienten die Randsequenzen in erster Linie der Identifikation der Proben.

Wahl der Belichtungsdosen Als Belichtungswellenlänge wurde 266 nm gewählt. Im Vordergrund stand hierbei die annähernd gleichmäßige Anregung aller vier kanonischen DNA-Basen mit hoher Effizienz (vgl. [Abbildung 1.2](#)). Für die Wahl der Belichtungsdosen galt es zwei Punkte zu beachten: Einerseits sollten durch die Belichtung hinreichend viele Moleküle geschädigt werden, um signifikante Veränderungen in deren Verteilung zu detektieren. Andererseits sollten zur enzymatischen Replikation genügend Moleküle ungeschädigt bleiben. Zur Ermittlung geeigneter Belichtungsdosen wurden Langzeitbelichtungen an der Sequenz ACAC NNNN ACAC durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionsänderung bei 266 nm nach der in [Abschnitt 3.3](#) beschriebenen Vorgehensweise untersucht.

Die Ergebnisse sind in [Abbildung 5.1](#) aufgetragen. Im linken Bild sind die Untergrund korrigierten Differenzspektren bei einer Belichtungsleistung von 2.2 mW zu verschiedenen Zeiten gezeigt. Dabei fällt auf, dass das Maximum der verschwindenden Bande bei 266 nm liegt. Bei 306 nm tritt eine starke positive Bande hervor. Diese befindet sich in der Nähe der T(6-4)T Bande [[SGZ15](#)]. Die Bandenform ist jedoch unterschiedlich und das Maximum im Vergleich zu den Positivbanden bei ACTTCA und dem zugehörigen Doppelstrang (vgl. [Abbildung 3.9](#)) blauverschoben. Dies lässt einen Beitrag des 6-4 Schadens vermuten, weist jedoch auch auf die mögliche Entstehung anderer Schäden hin. Im rechten Bild ist die Absorptionsänderung bei 266 nm gegen die Belichtungsdosis aufgetragen. Die schadensbedingte Absorptionsabnahme der gesamten Probe nach einer Belichtungsdosis von 19.2 J bei 266 nm beträgt

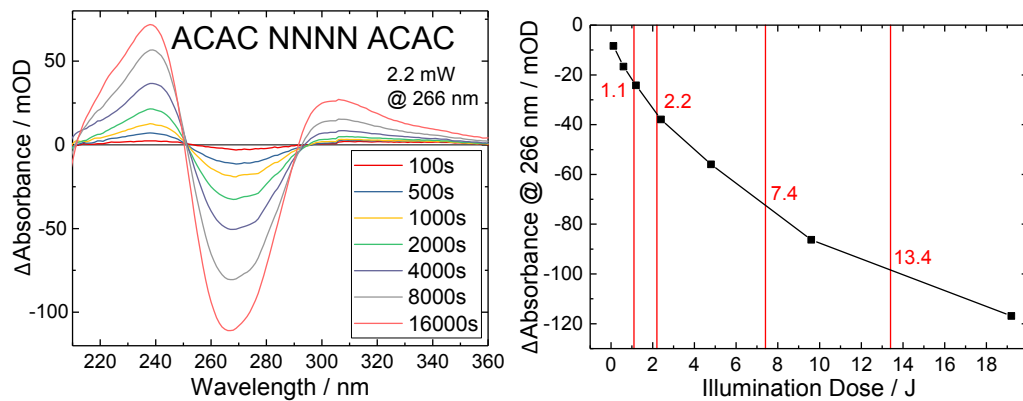


Abbildung 5.1.: Testbelichtung der Sequenz ACAC NNNN ACAC. Links: Untergrund korrigierte Differenzspektren bei UVC-Belichtung (266 nm, 2.2 mW). Rechts: Absorptionsänderungen bei 266 nm. Rot markiert sind die eingesetzten Belichtungs Dosen.

etwa 120 mOD. Diese liegt in der Größenordnung der Absorptionsänderung der Probe ACTTCA in [Abschnitt 3.3](#) nach Absorption von ca. 250 mJ bei 290 nm und diene als Anhaltspunkt für geeignete Belichtungs Dosen. Dies wurde später durch die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigt. Die verwendeten Belichtungs Dosen sind farblich hervorgehoben (rote senkrechte Linien).

Replikation geschädigter Sequenzen Die ursprüngliche Annahme, dass geschädigte Sequenzen nicht von den eingesetzten Polymerase repliziert werden, wurde exemplarisch für den T(CPD)T Schaden überprüft. Hierzu wurden verschiedene T(CPD)T geschädigte Oligonukleotide mit ihren zugehörigen intakten Sequenzen verglichen. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in [Abbildung 5.2](#) aufgeführt.

Dabei zeigen sich Unterschiede in der Häufigkeit von drei bis vier Größenordnungen. Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen der einzelnen Proben werden auf weniger als eine Größenordnung geschätzt. Daraus geht hervor, dass die verwendeten Polymerasen die Replikation T(CPD)T geschädigter Sequenzen stark unterdrücken. Dies gibt Hinweise darauf, dass der Hauptanteil der sequenzierten Oligonukleotide ursprünglich intakten Sequenzen entstammt.

Die unterdrückte Replikation bei T(CPD)T geschädigten Sequenzen [Abbildung 5.2](#) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die sterische Deformation des Photodimers gegenüber dem intakten Strang zurückzuführen [[Ban09](#)], welche die Enzymfunktion lokal beeinträchtigt. Photoschäden an einzelnen Basen, wie zum Beispiel oxidative Schäden, nehmen keinen derartigen Einfluss auf die Geometrie des gesamten Stranges. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Schäden die Replikation nicht in diesem Ausmaß unterdrücken und folglich nicht erkannt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Photoschäden einzelner Basen, welche etwa zwei bis drei Größenordnungen seltener auftreten als T(CPD)T (vgl. [Tabelle 2.1](#)), selbst bei gleicher Sensitivität

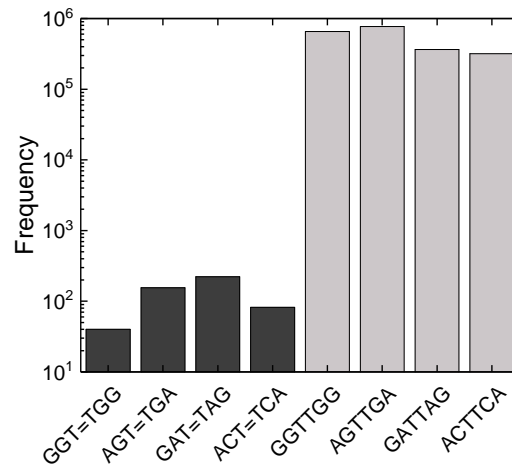


Abbildung 5.2.: Sequenzierung T(CPD)T geschädigter Oligonukleotide und ihrer korrespondierenden intakten Sequenzen.

der Polymerasen, einen sehr kleinen, wahrscheinlich vernachlässigbaren Beitrag zur Häufigkeitsverteilung liefern würden.

Polymerase-abhängige Effekte Dass die eingesetzten Polymerasen alle vorhandenen Sequenzen im gleichen Ausmaß replizieren, ist eine Voraussetzung für die vorgenommenen quantitativen Auswertungen. Durch die Polymerase verursachte Einflüsse auf die Häufigkeitsverteilungen der Sequenzen lassen sich nicht von Effekten unterscheiden, die durch Syntheseartefakte (sequenzabhängige Unterschiede in der Oligomerhäufigkeit) hervorgerufen werden. Die exemplarische Untersuchung einzelner Sequenzen in [Abbildung 5.2](#) ergab Unterschiede in den Häufigkeiten im Rahmen einer Größenordnung, wie sie auf Konzentrationsdifferenzen zurückzuführen sein können. Bei weiteren Hexameren der Sequenzen ATTTTA, TTTTTT und TCTTCT ergab sich jedoch eine Diskrepanz in der Häufigkeit der Probe ATTTTA um zwei Größenordnungen zu den restlichen Proben ([Abbildung 5.3 A](#)). Ob dieser Effekt durch eine sequenzselektive Replikation durch die verwendeten Polymerasen entstanden ist, wurde durch einen Vergleich mit den zentralen Hexameren in der Probe ACAC NNNN NNNN ACAC überprüft ([Abbildung 5.3 B](#)). Unterschiede in den Häufigkeiten der einzelnen Sequenzen können auf die Synthese zurückzuführen sein. Insgesamt zeigt sich in allen vier Referenzproben eine ähnliche Verteilung mit leicht unterschiedlichen Konzentrationen. Die Streuung der Häufigkeiten der einzelnen Sequenzen liegt innerhalb einer Größenordnung. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die Unterdrückung der Sequenz ATTTTA in Diagramm A nicht durch die Polymerasen hervorgerufen wurden, sondern beispielsweise auf unterschiedliche Probenkonzentrationen zurückzuführen ist.

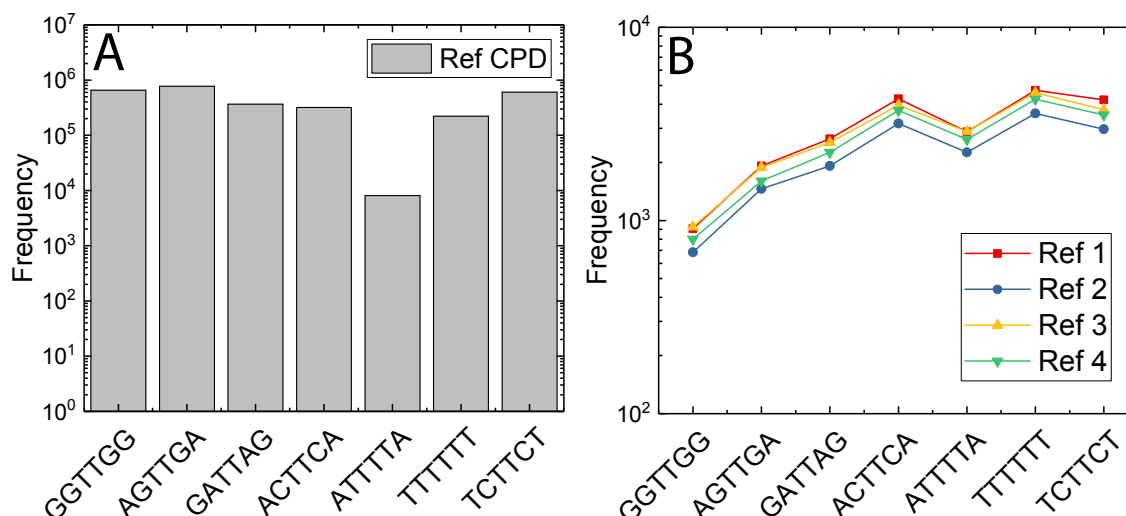


Abbildung 5.3.: Häufigkeiten ausgewählter Hexamere aus verschiedenen Synthesen (A) [vgl. [Abbildung 5.2](#)] und aus den zentralen Basen der Sequenz ACACN NNNNNN NACAC ohne Normierungen.

Probenpräparation Die verwendeten Oligonukleotide wurden kommerziell erworben (Synthese durch *biomers.net*). Analysebedingt wurden sehr geringe Probenvolumina von 100 μ l in Quarz-Küvetten der Schichtdicke 1 mm (*Hellma*) belichtet. Die Konzentration der Proben bezogen auf einzelne Basen betrug 3 mM. Als Puffer wurde Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verwendet. Zur Durchmischung wurde der in [Unterabschnitt 3.2.3](#) vorgestellte Magnetrührer eingesetzt. Aufgrund der geringen Küvettendicke befand sich der zugehörige Magnetrührmotor hinter der Küvette und somit im Strahlengang des Detektors (vgl. [Abbildung 3.1](#)). Daher wurden während der Belichtung auf die Messung der transmittierten Leistung verzichtet. Zur Entnahme der belichteten Proben aus den 1 mm-Küvetten wurden Spritzen eingesetzt, welche ausschließlich am Küvettenrand eingeführt wurden, um ein Verkratzen der Küvette im Belichtungsfenster zu vermeiden. Die weitere Probenpräparation, Küvettenreinigung, sowie der weitere Belichtungsaufbau sind wie in [Unterabschnitt 3.2.4](#) beschrieben.

5.3. Datenauswertung

Die Zuordnung der amplifizierten Cluster zu den Proben anhand der zugefügten Index-Sequenzen erfolgt noch bei der Sequenzierung (Illumina). Dabei wird zusätzlich ein Güte Wert, welcher sich aus dem Rauschsignal der Fluoreszenz beim Auslesevorgang ergibt, mit abgespeichert. Dieser differenziert in 40 Gütestufen, von denen die ersten 20 in der Auswertung berücksichtigt wurden. Die anfangs eingeführten Randsequenzen dienten zudem der Identifizierung korrekter Replikationen und somit

als weiteres Gütekriterium für die Datensätze. Für die Auswertung wurden diese aus den Datensätzen entfernt.

Synthesebedingt gehorchen die Sequenzen X in einer Probenlieferung der Verteilung $N_0(X)$. Werden demselben Vorrat zweimal unabhängig voneinander Proben entnommen und sequenziert, kommt es in der Regel zu Konzentrationsunterschieden, welche bei der Sequenzierung das Ergebnis $c \cdot N_0(X)$ hervorrufen. Belichtung mit der Dosis $E(t)$ führt über die Zeit t zur exponentiellen Abnahme der Anzahl intakter Oligonukleotide mit der sequenzabhängigen Konstante $E_{seq}(X)$. Diese entspricht außerdem der Dosis, bei der die Anzahl intakter Oligomere der Sequenz X um einen Faktor $1/e$ abgefallen ist. Die Anzahl überlebender Sequenzen $N(X)$ nach Belichtung mit der Dosis E lässt sich wie folgt darstellen.

$$N(X,t) = c \cdot N_0(X) \cdot e^{-\frac{E(t)}{E_{seq}(X)}} \quad (5.1)$$

Normierung auf die Verteilung der unbelichteten Probe $N_0(X)$ liefert den exponentiellen Zerfallsterm. Die Konzentrationsabhängigkeit c wird eliminiert durch die Normierung auf die photostabilsten Sequenzen. Hierzu werden alle Verteilungen einer kompletten Messreihe mit unterschiedlichen Belichtungs Dosen $E(t)$ auf ihre häufigsten gemeinsamen Sequenzen durchsucht. Dabei wird angenommen, dass deren Häufigkeit durch die Belichtung kaum beeinflusst werden. Die Häufigkeiten der beiden am öftesten auftretenden Sequenzen werden gemittelt. Auf diesen Wert wird daraufhin normiert. Dieser Wert entspricht der Konstanten c . Somit verbleibt der Exponentialterm in (5.1) als Betrachtungsgröße. Für die betrachtete breite Statistik von ca. 40 Millionen Reads pro Probe, entspricht dieser einer normierten Überlebenswahrscheinlichkeit der einzelnen Sequenzen und nähert sich folglich dem Wert 1 für sehr photostabile und wird klein für instabile Sequenzen. Die Messergebnisse zur Überlebenswahrscheinlichkeit implizieren die enzymatische Replikationswahrscheinlichkeit der Sequenzen. Dies steht in nahem Bezug zu biologischen Systemen.

Sequenzabhängige Effekte Eine potentielle Fehlerquelle bei der Belichtung sind neben Verunreinigungen in der Küvette, Wechselwirkungen der Probe mit den Küvet tengläsern. Eine sequenzabhängige Adhäsion $\eta(X)$ würde die Häufigkeitsverteilung in der Probe beeinflussen. Da diese nicht von der Belichtung abhinge, sondern von den Glasoberflächen, ginge diese linear in die Häufigkeitsverteilung ein. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der hergestellte Magnetrührer die Probe beim Rührvorgang mechanisch zerstört. Dieser Beitrag wäre zeitabhängig und durch die Zeit $\tau(X)$ beschreiben, nach der die Anzahl der Probenmoleküle auf einen Faktor $1/e$ gesunken wäre. Unter Berücksichtigung dieser Fehlermöglichkeiten würde sich Gleichung ergeben zu:

$$N(X,t) = c \cdot \eta(X) \cdot N_0(X) \cdot e^{-t(\frac{P}{E_{seq}(X)} + \frac{1}{\tau(X)})} \quad (5.2)$$

Dabei verkörpert P die Belichtungsleistung. Der Beitrag durch die Adhäsion der Probe wird bei der Referenzierung auf die unbelichtete Referenzprobe eliminiert. Ob der Magnetprüher die Probe beeinträchtigt wurde anhand einer Reihe von Dunkelexperimenten untersucht. Zusätzlich wurde hierbei der Einfluss mehrstündiger Lagerung bei Raumtemperatur untersucht. Implizit werden dadurch auch unterschiedliche Index-Sequenzen verglichen, wie sie zur Identifikation der einzelnen Proben eingesetzt wurden. [Abbildung 5.4](#) stellt die Ergebnisse der entsprechenden Dunkelmessungen gegenüber.

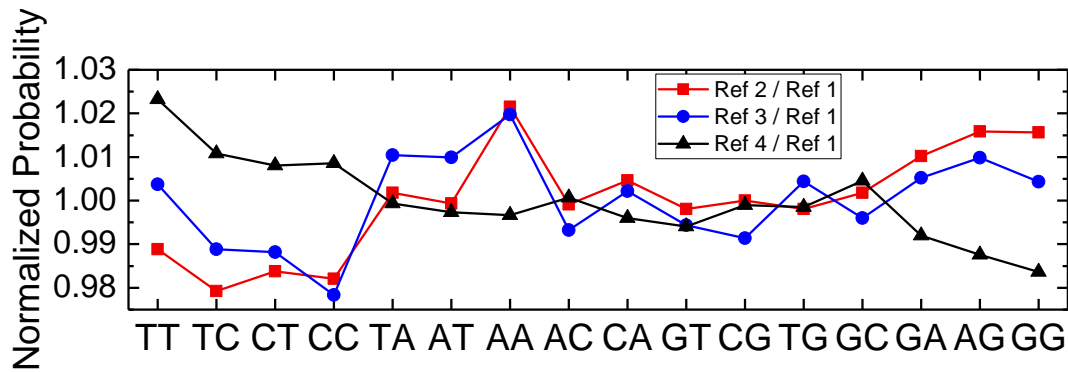


Abbildung 5.4.: Normierte Überlebenswahrscheinlichkeit aller 16 Dimere in der Sequenz ACAC NNNN NNNN ACAC bei unbelichteten Referenzproben. Ref 1: Zu Beginn eingefroren, Ref 2: Nach einigen Stunden an Raumtemperatur eingefroren, Ref 3: Kurz durchmischt, Ref 4: Lange durchmischt.

Alle Proben wurden unmittelbar nach den Experimenten bei -80°C eingefroren. Normiert wurde auf die unbelichtete Referenzprobe, welche zu Beginn des Experimentes eingefroren wurde (Ref 1). Die Normierung auf die beiden häufigsten gemeinsamen Sequenzen aller Verteilungen gestaltete sich aufgrund der Ähnlichkeit der Messungen schwierig. Stattdessen wurde auf den Mittelwert aller Datenpunkte normiert. Die rote Kurve repräsentiert die mehrstündige Lagerung der Probe bei Raumtemperatur (Ref 2). Die beiden weiteren Referenzproben wurden unterschiedlich lange mit Hilfe des Magnetprühers vermischt: 7 min 58 sec (Ref 3) und 1 h 42 min 41 s (Ref 4). In allen Fällen sind statistische Abweichungen vom Mittelwert zu erkennen, welche jedoch nicht mit den Schädigungen aufgrund der Belichtung korrelieren ([Abbildung 5.5](#)). Dass die Proben durch längere Lagerung bei Raumtemperatur nicht beeinträchtigt werden, zeigt die Ähnlichkeit von Ref 2 und Ref 3. Sequenzabhängige Schädigungen der Probe durch lang anhaltende mechanische Vermischung, würden sich in Unterschieden zwischen Ref 3 und Ref 4 ausdrücken. Da alle Graphen im Rahmen von

2% um ihren Erwartungswert schwanken, ist davon auszugehen, dass die genannten systematischen Effekte die Messungen nicht stärker beeinflussen als die statistischen Fehler. Dieser Wert gibt außerdem einen Anhaltspunkt für die Ungenauigkeit der Sequenzierung. Folglich kann (5.1) im Rahmen der Genauigkeit für die Analyse der Daten verwendet werden.

5.4. Ergebnisse

Dass in der Sequenz ACAC NNNN ACAC mit einem Pyrimidin an der 1. statistischen Position bereits Pyrimidin-Dimere mit dem C der Randsequenz gebildet werden können, erschwert statistische Betrachtungen von an TT angrenzenden Basen. Daher wurde die Anzahl zufälliger Basen innerhalb der Sequenzen für die folgenden Betrachtungen auf 8 erhöht. Die Probe ACAC NNNN NNNN ACAC wurde in oben geschilderter Weise belichtet, sequenziert und ausgewertet. Hierbei wurden jeweils die beiden äußersten N aus der Analyse ausgeschlossen.

5.4.1. Dimere

Eine breite Statistik über mögliche Photodimer-Schäden liefern die normierten Überlebenswahrscheinlichkeiten aller 16 Dimer-Kombinationen. Diese sind in [Abbildung 5.5](#) für die vier in [Abbildung 5.1](#) eingeführten Belichtungs Dosen gegenübergestellt. Mit steigender Belichtungs Dosis sinken die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Sequenzen. Das Dimer mit der höchsten Photostabilität ist GG. Durch die in [Abschnitt 5.2](#) beschriebene Referenzierung, ist dessen normierte Überlebenswahrscheinlichkeit annähernd 1. Weiterhin sehr photostabil sind die Purin-Dimere AG und GA. Lediglich das AA Dimer sticht durch seine stärkere Schädigung hervor. Dies kann an der Bildung des AA Photoprodukts liegen, welches mit seiner Quantenausbeute in der Größenordnung von 10^{-3} nur eine Größenordnung unter dem T(CPD)T Schaden liegt. In Poly(A)-Strängen steigt die Schadens-Quantenausbeute bis zu einem Faktor von 2.5 gegenüber dem AA Dimer [[Mor90](#)].

Starke Schädigung tritt bei den Pyrimidin Dimeren auf. Am häufigsten werden TT Dimere geschädigt und an zweiter Stellen stehen TC Dimere. Daran schließen die Dimere CT und CC an. Diese Reihenfolge der relativen Häufigkeiten steht in Einklang mit den zugehörigen Schadens-Quantenausbeuten [[BBU15b](#)]. CC wird ähnlich häufig geschädigt wie die Dimere TA und AT. Das aus der Literatur bekannte TA Photoprodukt besitzt eine Quantenausbeute von $5 \cdot 10^{-4}$. Anders als bei den AA Schäden, sinkt die Häufigkeit von TA-Schäden mit der Länge der Oligonukleotide [[Mor90](#)]. Es sollte hervorgehoben werden, dass [Abbildung 5.5](#) die Überlebenswahrscheinlichkeit der Dimere in einzelsträngigen Oligomeren mit statistisch gewählten Nachbarbasen darstellt, was nicht mit der Überlebenswahrscheinlichkeit isolierter Dimere übereinstimmen muss! Ein Grund für die häufigere TA und AT Schädigung

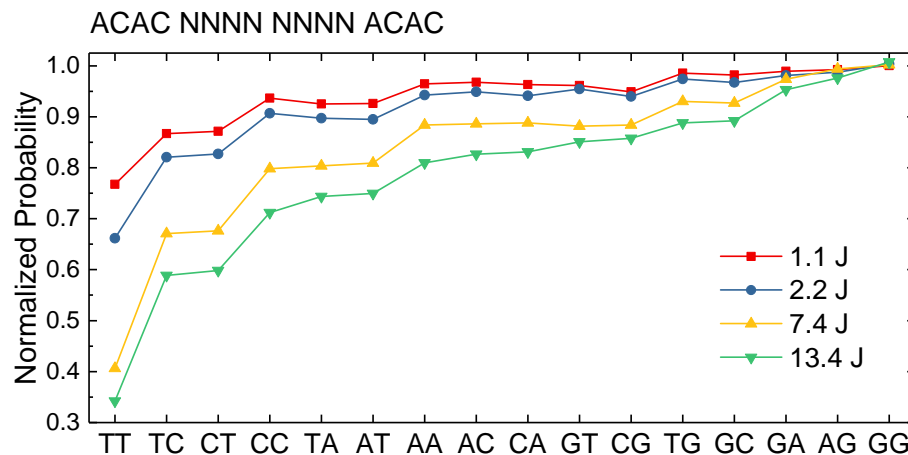


Abbildung 5.5.: Normierte Überlebenswahrscheinlichkeit aller 16 Dimere in der Sequenz ACAC NNNN NNNN ACAC bei unterschiedlichen Belichtungs-dosen. Für die Analyse wurden die Randsequenzen inklusive der äußersten beiden N ausgeschlossen. Es ist zu beachten, dass die hier beobachteten Schädigungen aufgrund der Nachbarschaft im Oligonukleotid nicht der Schädigung isolierter Dinukleotide (vgl. [Tabelle 2.1](#)) entsprechen müssen.

gegenüber AA könnte die Basenumgebung sein, welche in dieser Betrachtung nicht explizit berücksichtigt wird. Grenzt ein weiteres Pyrimidin an das Thymin der beiden genannten Dimere an, kann dies Schädigungseffekte hervorrufen, welche im Vergleich zu benachbarten Purinen wesentlich stärker ins Gewicht fallen. Derartige Effekte können für Abweichungen der analysierten Dimer-Häufigkeiten gegenüber den Literaturwerten für Schadens-Quantenausbeuten an Dimeren verantwortlich sein. Die weiteren Purin-Pyrimidin Dimere liegen in einem flachen plateau-ähnlichen Bereich der Kurven, was auf ähnliche Photostabilität hinweist. Die weitgehende Photoresistenz der Dinukleotide TG und CA werden von der Literatur bestätigt [Bos84]. Die Guanin enthaltenden Sequenzen sind dabei etwas photostabiler als Adenin enthaltende Dimere. Ein deutlicherer Anstieg ist in den Graphen der beiden stärksten Belichtungs-dosen erst wieder zu den anfangs angesprochenen Purin-Dimeren zu beobachten.

5.4.2. Trimere und Tetramere

Aus den Betrachtung zur T(CPD)T Reparatur ergibt sich die Fragestellung, in welcher Basennachbarschaft benachbarte Thymine die größte Photostabilität haben? Anders als in [Kapitel 3](#) wird mit dieser Fragestellung kein spezifischer Photoschaden betrachtet, sondern eine Vielzahl möglicher Schäden, wie z. B. T(CPD)T, T(6-4)T oder T(Dewar)T.

Dazu wurde der in [Unterabschnitt 5.4.1](#) beschriebene Datensatz auf Sequenzen der Länge 3 oder 4 Basen ausgeweitet. Anschließend wurde ein Filter angewandt, das Dimer TT an allen verbleibenden N-Positionen zu suchen und die benachbarten Basen auszugeben. Dies wurde für eine und für zwei benachbarte Basen jeweils am 5' und am 3' Ende des TT Dimers durchgeführt. [Abbildung 5.6](#) zeigt die Ergebnisse für eine Belichtungs-dosis von 13.4 J. Dazu wurde die normierte Überlebenswahrscheinlichkeit (Exponentialterm in (5.1)) gegen einzelne Sequenzen aufgetragen. Diagramm A zeigt die Trimer und B die Tetramer Resultate. Benachbarte Basen am 5' Ende sind schwarz, am 3' Ende blau dargestellt. Zusätzlich wurde die Häufigkeit des TT Dimers als horizontale gestrichelte Linie ergänzt.

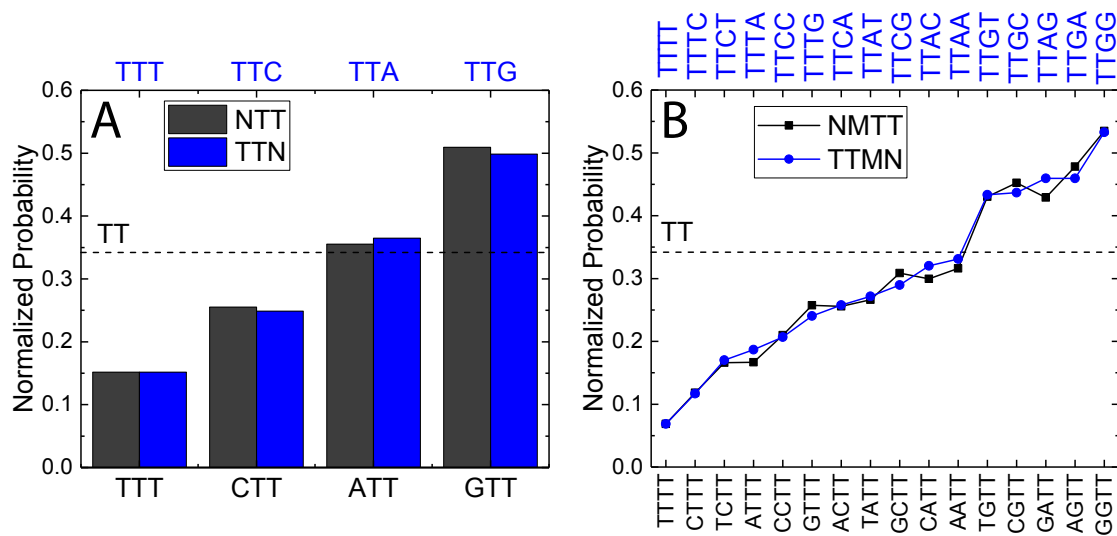


Abbildung 5.6.: Normierte Überlebenswahrscheinlichkeiten verschiedener TT enthaltender Tri- (A) und Tetramere (B) innerhalb der Sequenz ACAC NNNN NNNN ACAC.

Die separate Betrachtung der Trimere und Tetramere ermöglicht die Herausarbeitung unterschiedlicher Teilaspekte, welche durch die verschiedenen Darstellungen leichter veranschaulicht werden. Die Trimer-Darstellung (A) gibt Auskunft über generelle Tendenzen. So nimmt beispielsweise die Sequenz TTT deutlich mehr Schaden als CTT und TTC. Dies steht in Einklang mit den Quantenausbeuten der Pyrimidin-Schäden [LR93]. Insgesamt fallen die Unterschiede zwischen 5' und 3' Position der Nachbarbase gering aus. Kleine Abweichungen sind jedoch erkennbar. So wird für die Nachbarbasen G und C die 5' und für A die 3' Position relativ zum TT favorisiert. Ein angrenzendes Guanin hat den höchsten stabilisierenden Effekt. Die Trimer-Daten heben hervor, dass die benachbarten Basen die Überlebenswahrscheinlichkeiten kurzer Sequenzabschnitte wesentlich beeinflussen.

Eine detailliertere Aufschlüsselung bieten die Kurven in (B). Die Zuordnung der Tetramer-Sequenzen erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit symmetrisch. So wird

beispielsweise die Sequenz GATT zu TTAG anstelle von TTGA gegenübergestellt, wodurch die an TT angrenzende Base (hier A) unverändert bleibt. Die obige Beobachtung starker Schädigung Pyrimidin-reicher Sequenzen gemäß der Reihenfolge ihrer Quantenausbeuten bestätigt sich hier. Darunter liegen auch die Sequenzen ATTT und TTTA, welche durch ihre Thymin-Trimere stärker schädigen als CCTT und TTCC. Auffällig ist außerdem die Herausbildung eines deutlichen Plateaus oberhalb der TT-Linie. Einen stabilisierenden Einfluss haben benachbarte Purin-Paare, außerdem Pyrimidin-Guanin-Paare mit an das TT angrenzendem G. Die mit Abstand photostabilsten Sequenzen sind GGTT und TTGG. Knapp unterhalb der TT-Linie befinden sich die Sequenzen AATT und TTAA, bei denen das AA Dimer kaum Einfluss auf die Schadensbildung nimmt. Dass benachbarte Purin-Paare eine Tendenz zur Photostabilisierung aufweisen, gibt Hinweise darauf, dass auch die außenliegende Base an dem Vorgang beteiligt sein könnte. Eine Möglichkeit wäre ein Stabilisationsmechanismus durch die Ausbildung eines langlebigen CT-Zustandes neben dem TT. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass bei Anregung des TT ein kurzlebiger CT-Zustand mit dem angrenzenden Purin entsteht, wie etwa AT (75 ps, [Doo13](#)), TA (50 ps, [Pil14a](#)) oder GT (14 ps), was die Bildung eines TT Photoschadens hemmt (vgl. [Tabelle 3.6](#)).

Sequenzen, für die die TTNN photostabiler als die NNTT Sequenz ist, sind TTTA, TTAT, TTAC, TTAA und TTAG. Dies bestätigt die höhere Photostabilität von A am 3' Ende des TT bei den Trimeren. GTTT, CGTT und AGTT bestätigen die höhere Stabilität durch G am 5' Ende von TT und im Fall von GCTT sogar neben einem CT. Die Ursache hierfür könnten sterischen Gründe sein, die einen Ladungstransfer vom Guanin am 5' Ende und vom Adenin am 3' begünstigen. Die kürzere Lebensdauer von AG (280 ps) gegenüber GA (420 ps) stünde damit in Einklang. Im Vergleich von TTAG gegen GATT, verfügt TTAG über die höhere Photostabilität. Bei starken Belichtungs Dosen könnte dies auch auf den Sekundäreffekt der Selbstreparatur eines zuvor entstandenen T(CPD)T Schadens zurückzuführen sein (vgl. [Abschnitt 3.3](#)).

5.4.3. Zebrafisch

Das experimentell nachgestellte präbiotische Szenario zufällig verteilter DNA-Oligomere kurzer Länge gibt Auskunft über die sequenzselektiven Überlebenswahrscheinlichkeiten in breiter Statistik. Damit wird die evolutionäre Sequenzselektion nachgestellt. Im Lauf der Erdgeschichte haben sich Umweltbedingungen für die Organismen jedoch verändert. Durch die Ausbildung der Erdatmosphäre wird ein deutlicher Anteil der auf die Erdoberfläche eintreffenden UVC-Strahlung abgeschirmt (vgl. [Abbildung 1.2](#)). Außerdem haben sich im Lauf der Evolution enzymatische Reparaturmechanismen entwickelt, welche für moderne Organismen ein mächtiges Werkzeug zum Umgang mit UV-induzierten Photoschäden verkörpert [[San16](#)]. Dies bietet es den Organismen die Möglichkeit zur Ausbildung großteils UV-irresistenter Genome, wie in [Abbildung 5.7](#) an einer lebenden Spezies zu sehen ist.

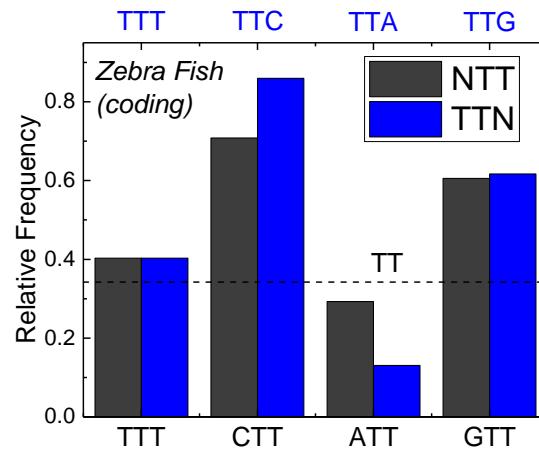


Abbildung 5.7.: Relative Häufigkeiten TT enthaltender Trimere innerhalb der codierenden Bereiche eines Zebrafisch-Genoms [18d].

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten TT enthaltender Trimere innerhalb der codierenden Bereiche eines Zebrafisch-Genoms [18d]. Auswertet wurden diese mit Hilfe eines Suchprogramms für DNA-Sequenzen, geschrieben von Prof. Dr. Wolfgang Zinth. Die Pyrimidin-Trimere CTC und TTC, welche CPD-Schäden ausbilden können, sind verhältnismäßig oft vertreten. Dagegen sind die Trimere ATT und TTA die seltensten. Die relativen Unterschiede zwischen den 5' (NTT) und 3' Sequenzen (TTN) sind deutlich stärker ausgeprägt als bei der untersuchten statistischen Verteilung. Die Ursachen hierfür liegen wahrscheinlich in zellinternen Abläufen begründet und reichen weit über photophysikalische Betrachtungen hinaus.

6. Zusammenfassung

Die ursprüngliche Fragestellung, ob DNA-Basen angrenzende Photoschäden beeinflussen können, kann zum Abschluss dieser Arbeit bejaht werden. Es wurden sowohl Einflüsse auf die Bildung neuer Photoschäden als auch auf die Reparatur vorhandener Schäden beobachtet. Die Reparatur des T(CPD)T und die Bildung des 8-OxoG Schadens wurden herausgegriffen und in kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden untersucht. Unter systematischer Variation der benachbarten Sequenzen wurden die Quantenausbeuten für Schädigung und Reparatur ermittelt.

T(CPD)T Selbstreparatur

T(CPD)T Schäden sind die häufigsten UV-induzierten Photoschäden im Erbgut (vgl. [Tabelle 2.1](#)). Zur Reparatur dieser Schäden gibt es neben der direkten Photoreparatur [[HIR07](#)] unterschiedliche enzymatische Mechanismen [[San16](#)]. Dass benachbarte Basen T(CPD)T Schäden ohne die Beteiligung von Enzymen in einem Photolyase-ähnlichen Mechanismus reparieren können, ist erst seit kurzem bekannt [[Buc16](#)]. Die Rolle langlebiger ladungsgetrennter Zustände im Hinblick auf die Photoreparatur des T(CPD)T wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenzselektiv durch stationäre Belichtungsexperimente und mit Hilfe von transienter Infrarot-Spektroskopie an kurzen Oligonukleotiden untersucht. Als neue Erkenntnis zeigten langlebige Zustände zwischen allen Purin-Dinukleotiden Potential zur Reparatur eines benachbarten T(CPD)T. Einzelne an einen T(CPD)T Schaden angrenzende Guanine wiesen ebenfalls Reparatüreigenschaften mit unterschiedlichem zugrunde liegenden Mechanismus auf. Experimente an kurzen doppelsträngigen Oligonukleotiden zeigten, dass die Hybridisierung zum Komplementärstrang sowohl die Photoschädigung als auch die Reparatur vorhandener T(CPD)T Schäden reduziert.

Die im Zuge dieser Arbeit gefundenen Reparatüreigenschaften gewisser DNA-Sequenzen können die Selektion in der frühen Entwicklung des Lebens nachhaltig beeinflusst haben. Unter stärkerer UV-Belastung und ohne enzymatische Unterstützung können die untersuchten intrinsischen Selbstreparaturmechanismen eine wichtige Rolle als Photostabilisatoren des präbiotischen Erbgutes gespielt haben. Die ermittelten Lebensdauern ladungsgetrennter Zustände auf unterschiedlichen Sequenzen liefern Grundlagen zum Verständnis photophysikalischer Prozesse auf DNA-Strängen.

8-OxoG Schadensbildung

Nach bisherigem Kenntnisstand gibt es für die oxidative Schädigung von Guanin zu 8-OxoG unterschiedliche Mechanismen [Cad17]. Ein Großteil der Studien bezieht sich auf die Schädigung durch ionisierende Strahlung (z. B. Ber10, Sch17b). Der Schädigungs-Mechanismus aufgrund von schwacher UVC-Strahlung, wie sie in frühen Entwicklungsstadien des Lebens plausibel ist, wurde bislang noch nicht im Detail aufgeklärt. Der Vorschlag nach der Beteiligung eines Guanin-Radikal-Kations wurde im Rahmen dieser Arbeit durch transiente Infrarot-Spektroskopie untersucht. Überraschenderweise zeigten die Lebensdauern ladungsgetrennter Zustände mit des UV-induzierten 8-OxoG Ausbeuten kurzer Oligonukleotide (HPLC-MS Analyse) keine Korrelation. Es gibt Hinweise darauf, dass die Schädigung über ultraschnelle Deprotonierung zum G-Neutralradikal und anschließende Hydratation mit dem Lösungsmittel stattfindet. Dabei stehen sterische Argumente gegenüber sequenzselektiven Aspekten im Vordergrund, wie Vergleiche von Oligonukleotiden unterschiedlicher Länge belegen. Der vorgeschlagene Mechanismus zeigt einen präbiotisch relevanten Entstehungsweg oxidativer Schäden, hervorgerufen durch schwache UVC-Strahlung.

Schadensbildung an statistischen Sequenzen

Die UV-induzierte Photoschädigung von einzelsträngigen Oligonukleotiden mit zufälligen Sequenzen wurde mit Hilfe des neuen Sequenzierverfahrens Sequencing by Synthesis [18c] untersucht. Vorteile dieser Methode liegen in der massiven Parallelität der Sequenzierung, wodurch simultan eine zuverlässige Datenstatistik über alle möglichen Photoschäden erzielt werden konnte. Die Untersuchung kurzer Oligonukleotide zufälliger Sequenzen unter UV-Bestrahlung stellt die Selektion in frühen Entwicklungsstadien des Lebens nach. Im Gegensatz zu Studien isolierter Photoschäden ist hierbei besonders hervorzuheben, dass durch die Stränge die Einflüsse benachbarter Basen herausgearbeitet werden konnten. Diese spielen für das Überleben genetischer Information eine wichtigere Rolle als die Überlebenswahrscheinlichkeit einzelner Mono- oder Dinukleotide. Abgesehen von Einflüssen, welche auf die Basennachbarschaft zurückzuführen sind, stehen die statistischen Analysen aller im Strang enthaltenen Dimer-Kombinationen in Einklang mit den Quantenausbeuten aus der Literatur bekannter Photoschäden. Tri- und Tetramer-Ausschnitte der Oligonukleotide, welche das für Photoschädigung stark anfällige Dimer TT enthalten, zeigten stark ausgeprägte sequenzselektive Einflüsse der benachbarten Basen auf die Photostabilität. Es ist daher anzunehmen, dass derartige sequenzselektive Photostabilisierungsmechanismen die Entwicklung des frühen Lebens beeinflusst haben könnten. Damit tragen die hier dargestellten Ergebnisse zu dem sich rasch weiterentwickelnden Forschungsfeld nach den Ursprüngen des Lebens bei.

A. Anhang

Ausgewertete Zeitverläufe der TRIR Messungen

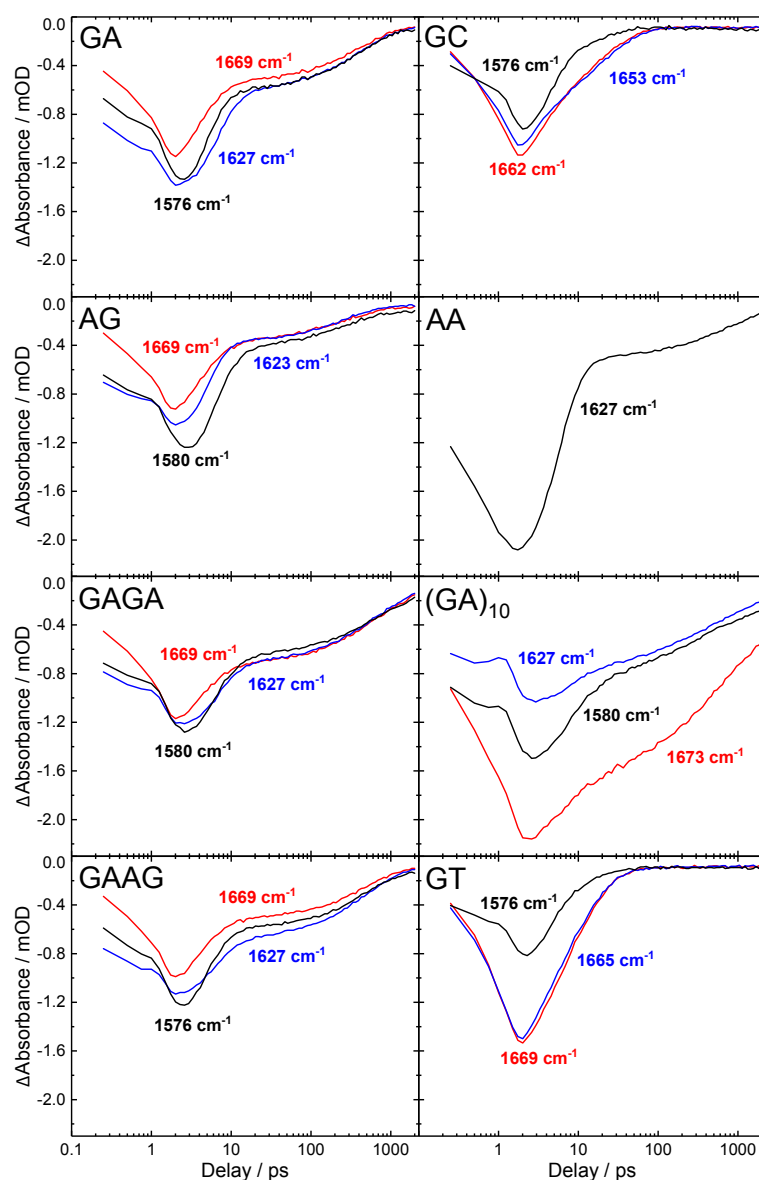


Abbildung A.1.: In [Unterabschnitt 3.4.2](#) und [Unterabschnitt 4.4.1](#) ausgewertete Zeitverläufe. Dargestellt sind die Wellenzahlen mit den maximalen GSB Signaturen.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1.1. DNA-Strukturformeln | 1 |
| 1.2. DNA-Absorptionsspektren | 2 |
| 2.1. Schema Basenpaarungen | 6 |
| 2.2. Energieschema UV-angeregter DNA | 7 |
| 2.3. Typische UV-induzierte Photoschäden | 9 |
| 3.1. Belichtungsaufbau | 21 |
| 3.2. Laser-Leistungsschwankungen | 23 |
| 3.3. Beer-Lambert-Gesetz | 25 |
| 3.4. Anrege-Abtast-Aufbau | 29 |
| 3.5. Anrege-Zweig | 30 |
| 3.6. Abtast-Zweig | 31 |
| 3.7. MCT Wellenlängen-Korrektur | 32 |
| 3.8. GAT=T Absorptionsänderung | 33 |
| 3.9. UV-Differenzspektren | 34 |
| 3.10. Proben-Chargen | 37 |
| 3.11. GATT Reproduzierbarkeit | 39 |
| 3.12. T(CPD)T Schädigung und Reparatur | 41 |
| 3.13. AAT=TAA-Korrektur | 45 |
| 3.14. Schmelzkurven | 47 |
| 3.15. HPLC der doppelsträngigen CPD-Proben | 48 |
| 3.16. Pyr(CPD)Pyr Schädigung | 49 |
| 3.17. CPD-Möglichkeiten | 50 |
| 3.18. ACT=TCA Differenzspektren | 51 |
| 3.19. HPLC der einzelsträngigen CPD-Proben | 54 |
| 3.20. GG Aggregation | 56 |
| 3.21. Gaussian Funktionale | 58 |
| 3.22. Gaussian DNA-Basen | 60 |
| 3.23. TRIR GA | 61 |
| 3.24. TRIR 3D Darstellung (CPD) | 62 |
| 3.25. TRIR DADS (CPD) | 64 |
| 3.26. TRIR Lösungsmittel Korrektur | 65 |
| 3.27. TRIR Globale Anpassung | 67 |
| 3.28. TRIR Quantenausbeute (CPD) | 70 |

| | |
|--|-----|
| 4.1. 8-OxoG Entstehungswege | 76 |
| 4.2. Verdau-Test | 79 |
| 4.3. 8-OxoG Schädigung | 81 |
| 4.4. 8-OxoG Folgereaktionen | 83 |
| 4.5. 8-OxoG Referenzierung | 85 |
| 4.6. 8-OxoG Schädigung referenziert auf GT | 88 |
| 4.7. TRIR 3D Darstellung (8-OxoG) | 90 |
| 4.8. TRIR DADS (8-OxoG) | 92 |
| 4.9. TRIR Quantenausbeute (8-OxoG) | 93 |
| 4.10. TRIR vs. 8-OxoG Schädigung | 94 |
| 4.11. Weitere 8-OxoG Messungen | 96 |
| 4.12. 4-ThioTG Schädigung | 98 |
| 5.1. Wahl der Belichtungsdosis | 104 |
| 5.2. Sequenzierung von T(CPD)T Proben | 105 |
| 5.3. Hexamer-Häufigkeiten | 106 |
| 5.4. Sequenzierung von Dunkelproben | 108 |
| 5.5. Dimer-Häufigkeiten | 110 |
| 5.6. Tri- und Tetramer-Häufigkeiten | 111 |
| 5.7. Trimer-Häufigkeiten im Zebrafisch-Genom | 113 |
| A.1. GSB Zeitverläufe | 117 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| 2.1. Typische UV-induzierte DNA-Schäden | 11 |
| 3.1. Redoxpotentiale | 14 |
| 3.2. Probenliste (CPD) | 15 |
| 3.3. Extinktionskoeffizienten bei 290 nm | 40 |
| 3.4. Quantenausbeuten T(CPD)T | 41 |
| 3.5. TRIR Globale Anpassung (CPD) | 68 |
| 3.6. Dimer Kombinationen | 72 |
| 4.1. 8-OxoG Analyse | 84 |
| 4.2. Quantenausbeuten 8-OxoG | 87 |
| 4.3. Guanin Gewichtungsfaktoren | 87 |
| 4.4. TRIR Globale Anpassung (8-OxoG) | 94 |

Literatur

- [AFB15] O. R. Alshykhly, A. M. Fleming und C. J. Burrows. *5-Carboxamido-5-formamido-2-iminohydantoin, in Addition to 8-oxo-7,8-Dihydroguanine, Is the Major Product of the Iron-Fenton or X-ray Radiation-Induced Oxidation of Guanine under Aerobic Reducing Conditions in Nucleoside and DNA Contexts*. J. Org. Chem. 80(14) (Juli 2015), S. 6996–7007.
- [Ang97] D. Angelov, A. Spassky, M. Berger und J. Cadet. *High-Intensity UV Laser Photolysis of DNA and Purine 2'-Deoxyribonucleosides: Formation of 8-Oxopurine Damage and Oligonucleotide Strand Cleavage as Revealed by HPLC and Gel Electrophoresis Studies*. J. Am. Chem. Soc. 119(47) (Nov. 1997), S. 11373–11380.
- [Ban09] A. Banyasz, S. Karpati, E. Lazzarotto, D. Markovitsi und T. Douki. *UV-Induced Structural Changes of Model DNA Helices Probed by Optical Spectroscopy*. J. Phys. Chem. C 113(27) (Mai 2009), S. 11747–11750.
- [Ban12] A. Banyasz et al. *Electronic Excited States Responsible for Dimer Formation upon UV Absorption Directly by Thymine Strands: Joint Experimental and Theoretical Study*. J. Am. Chem. Soc. 134(36) (Sep. 2012), S. 14834–14845.
- [Ban17] A. Banyasz et al. *Absorption of Low-Energy UV Radiation by Human Telomere G-Quadruplexes Generates Long-Lived Guanine Radical Cations*. J. Am. Chem. Soc. 139(30) (Aug. 2017), S. 10561–10568.
- [BBU15a] M. Barbatti, A. C. Borin und S. Ullrich. *Photoinduced Processes in Nucleic Acids I – Nucleobases in the Gas Phase and in Solvents*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- [BBU15b] M. Barbatti, A. C. Borin und S. Ullrich. *Photoinduced Processes in Nucleic Acids II – DNA Fragments and Phenomenological Aspects*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- [Bee52] Beer. *Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten*. Ann. Phys. 162(5) (Jan. 1852), S. 78–88.
- [Ber10] F. Bergeron, F. Auvré, J. P. Radicella und J.-L. Ravanat. *HO• radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(12) (März 2010), S. 5528–5533.

- [BH04] A. Buhot und A. Halperin. *Effects of stacking on the configurations and elasticity of single-stranded nucleic acids*. Phys. Rev. E 70(2) (Aug. 2004), S. 020902.
- [Bla11] G. Blankenburg. *Aufbau und Charakterisierung eines 2D-Infrarot-Systems zur Untersuchung von dynamischen Prozessen in Molekülen*. München, 2011.
- [Boo90] R. J. Boorstein, T. P. Hilbert, R. P. Cunningham und G. W. Teebor. *Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA*. Biochemistry 29(46) (Nov. 1990), S. 10455–10460.
- [Bos84] S. N. Bose, S. Kumar, R. J. H. Davies, S. K. Sethi und J. A. McCloskey. *The photochemistry of d(T-A) in aqueous solution and in ice*. Nucleic Acids Res. 12(20) (Okt. 1984), S. 7929–7947.
- [Bou03] B. Bouvier et al. *Influence of Conformational Dynamics on the Exciton States of DNA Oligomers*. J. Phys. Chem. B 107(48) (Nov. 2003), S. 13512–13522.
- [BSG03] M. Banyay, M. Sarkar und A. Gräslund. *A library of IR bands of nucleic acids in solution*. Biophys. Chem. 104(2) (Juni 2003), S. 477–488.
- [BTS06] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer. *Biochemistry, 6th Edition*. W. H. Freeman, Mai 2006.
- [Buc14a] D. B. Bucher, B. M. Pilles, T. Carell und W. Zinth. *Charge separation and charge delocalization identified in long-living states of photoexcited DNA*. PNAS 111(12) (März 2014), S. 4369–4374.
- [Buc14b] D. B. Bucher, A. Schlueter, T. Carell und W. Zinth. *Watson–Crick Base Pairing Controls Excited-State Decay in Natural DNA*. Angew. Chem. Int. Ed. 53(42) (Okt. 2014), S. 11366–11369.
- [Buc15] D. B. Bucher. *Femtosecond vibrational spectroscopy – Influence of Base Stacking and Base Pairing on the Excited-State Deactivation of DNA*. PhD Thesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, Jan. 2015.
- [Buc16] D. B. Bucher, C. L. Kufner, A. Schlueter, T. Carell und W. Zinth. *UV-Induced Charge Transfer States in DNA Promote Sequence Selective Self-Repair*. J. Am. Chem. Soc. 138(1) (Jan. 2016), S. 186–190.
- [Cad17] J. Cadet, K. J. A. Davies, M. H. Medeiros, P. Di Mascio und J. R. Wagner. *Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA*. Free Radical Biology and Medicine. Oxidative DNA Damage & Repair 107(Supplement C) (Juni 2017), S. 13–34.
- [CCK05] C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen und B. Kohler. *Base stacking controls excited-state dynamics in A T DNA*. Nature 436(7054) (Aug. 2005), S. 1141–1144.

- [CCK06] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen und B. Kohler. *Molecular spectroscopy: Complexity of excited-state dynamics in DNA (Reply)*. Nature 441(7094) (Juni 2006), E8.
- [CD17] J. Cadet und K. J. A. Davies. *Oxidative DNA damage & repair: An introduction*. Free Radical Biology and Medicine 107 (Juni 2017), S. 2–12.
- [CD18] J. Cadet und T. Douki. *Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development*. Photochem. Photobiol. Sci. (Jan. 2018).
- [CDR15] J. Cadet, T. Douki und J.-L. Ravanat. *Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation*. Photochemistry and Photobiology 91 (2015), S. 140–155.
- [CGD14] J. Cadet, A. Grand und T. Douki. *Solar UV Radiation-Induced DNA Bipyrimidine Photoproducts: Formation and Mechanistic Insights*. SpringerLink (2014), S. 249–275.
- [CHK03] B. Cohen, P. M. Hare und B. Kohler. *Ultrafast Excited-State Dynamics of Adenine and Monomethylated Adenines in Solution: Implications for the Nonradiative Decay Mechanism*. J. Am. Chem. Soc. 125(44) (Okt. 2003), S. 13594–13601.
- [CK04] C. E. Crespo-Hernandez und B. Kohler. *Influence of Secondary Structure on Electronic Energy Relaxation in Adenine Homopolymers*. J. Phys. Chem. B 108(30) (Juni 2004), S. 11182–11188.
- [CK14] J. Chen und B. Kohler. *Base Stacking in Adenosine Dimers Revealed by Femtosecond Transient Absorption Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc. 136(17) (Apr. 2014), S. 6362–6372.
- [Cre04] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare und B. Kohler. *Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids*. Chem. Rev. 104(4) (Apr. 2004), S. 1977–2020.
- [CS04] D. J.-F. Chinnapen und D. Sen. *A deoxyribozyme that harnesses light to repair thymine dimers in DNA*. PNAS 101(1) (Juni 2004), S. 65–69.
- [CV90] J. Cadet und P. Vigny. *The photochemistry of nucleic acid in bioorganic photochemistry*. Bd. 1. Bioorganic Photochemistry, Photochemistry and the Nucleic Acids. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1990.
- [Dom15] P. N. Dominguez, F. T. Lehner, J. Michelmann, M. Himmelstoss und W. Zinth. *A magnetic stirring setup for applications in ultrafast spectroscopy of photo-sensitive solutions*. Rev. Sci. Instrum. 86(3) (März 2015), S. 033101.

- [Doo13] G. W. Doorley et al. *Tracking DNA Excited States by Picosecond-Time-Resolved Infrared Spectroscopy: Signature Band for a Charge-Transfer Excited State in Stacked Adenine–Thymine Systems*. J. Phys. Chem. Lett. 4(16) (Aug. 2013), S. 2739–2744.
- [DRC02] T. Douki, J. Rivière und J. Cadet. *DNA Tandem Lesions Containing 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and Formamido Residues Arise from Intramolecular Addition of Thymine Peroxyl Radical to Guanine*. Chem. Res. Toxicol. 15(3) (März 2002), S. 445–454.
- [DS65] J. E. Donnellan und R. B. Setlow. *Thymine Photoproducts but not Thymine Dimers Found in Ultraviolet-Irradiated Bacterial Spores*. Science 149(3681) (Juli 1965), S. 308–310.
- [FDB17] A. M. Fleming, Y. Ding und C. J. Burrows. *Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair*. PNAS 114(10) (Juli 2017), S. 2604–2609.
- [Fle11] A. M. Fleming, J. G. Muller, I. Ji und C. J. Burrows. *Characterization of 2'-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system Cu(II)/H₂O₂/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts*. Org. Biomol. Chem. 9(9) (Apr. 2011), S. 3338–3348.
- [Fle13] A. M. Fleming et al. *Reconciliation of Chemical, Enzymatic, Spectroscopic and Computational Data To Assign the Absolute Configuration of the DNA Base Lesion Spiroiminodihydantoin*. J. Am. Chem. Soc. 135(48) (Nov. 2013), S. 18191–18204.
- [FMR76] G. R. Fleming, J. M. Morris und G. W. Robinson. *Direct observation of rotational diffusion by picosecond spectroscopy*. Chem. Phys. 17(1) (Okt. 1976), S. 91–100.
- [Gaj17] M. Gajarsky et al. *Structure of a Stable G-Hairpin*. J. Am. Chem. Soc. 139(10) (März 2017), S. 3591–3594.
- [Gom16] M. Gomez-Mendoza, A. Banyasz, T. Douki, D. Markovitsi und J.-L. Ravanat. *Direct Oxidative Damage of Naked DNA Generated upon Absorption of UV Radiation by Nucleobases*. The Journal of Physical Chemistry Letters 7(19) (Okt. 2016), S. 3945–3948.
- [Gör91] H. Görner. *Chromophore loss of uracil derivatives and polyuridylic acid in aqueous solution caused by 248 nm laser pulses and continuous UV irradiation: Mechanism of the photohydration of pyrimidines*. J. Photochem. Photobiol., B 10(1) (Juli 1991), S. 91–110.
- [Gou90] I. R. Gould, D. Ege, J. E. Moser und S. Farid. *Efficiencies of photoinduced electron-transfer reactions: role of the Marcus inverted region in return electron transfer within geminate radical-ion pairs*. J. Am. Chem. Soc. 112(11) (Mai 1990), S. 4290–4301.

- [Hai12] K. Haiser et al. *Mechanism of UV-Induced Formation of Dewar Lesions in DNA*. Angew. Chem. Int. Ed. 51(2) (Jan. 2012), S. 408–411.
- [Har07] Y. Harada, T. Suzuki, T. Ichimura und Y.-Z. Xu. *Triplet Formation of 4-Thiothymidine and Its Photosensitization to Oxygen Studied by Time-Resolved Thermal Lensing Technique*. J. Phys. Chem. B 111(19) (Mai 2007), S. 5518–5524.
- [HIR07] M. R. Holman, T. Ito und S. E. Rokita. *Self-Repair of Thymine Dimer in Duplex DNA*. J. Am. Chem. Soc. 129(1) (Jan. 2007), S. 6–7.
- [HOZ98] P. Hamm, S. M. Ohline und W. Zinth. *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene measured by femtosecond infrared spectroscopy*. J. Chem. Phys. 106(2) (Juni 1998), S. 519.
- [Hu15] J. Hu, S. Adar, C. P. Selby, J. D. Lieb und A. Sancar. *Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution*. Genes Dev. 29(9) (Jan. 2015), S. 948–960.
- [Isa04] J. Isaksson, S. Acharya, J. Barman, P. Cheruku und J. Chattopadhyaya. *Single-Stranded Adenine-Rich DNA and RNA Retain Structural Characteristics of Their Respective Double-Stranded Conformations and Show Directional Differences in Stacking Pattern*. Biochemistry 43(51) (Nov. 2004), S. 15996–16010.
- [Jor98] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher und M. E. Michel-Beyerle. *Charge transfer and transport in DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95(22) (Okt. 1998), S. 12759–12765.
- [Kan10] S. Kanvah et al. *Oxidation of DNA: Damage to Nucleobases*. Acc. Chem. Res. 43(2) (Feb. 2010), S. 280–287.
- [Kar13] M. Karpefors, P. Ädelroth, A. Aagaard, I. A. Smirnova und P. Brzezinski. *The Deuterium Isotope Effect as a Tool to Investigate Enzyme Catalysis: Proton-Transfer Control Mechanisms in Cytochrome c Oxidase*. Isr. J. Chem. 39(34) (Nov. 2013), S. 427–437.
- [Kli03] J. P. Klinman. *Dynamic barriers and tunneling. New views of hydrogen transfer in enzyme reactions*. Pure Appl. Chem. 75(5) (Jan. 2003), S. 601–608.
- [KMP06] W.-M. Kwok, C. Ma und D. L. Phillips. *Femtosecond Time- and Wavelength-Resolved Fluorescence and Absorption Spectroscopic Study of the Excited States of Adenosine and an Adenine Oligomer*. J. Am. Chem. Soc. 128(36) (Aug. 2006), S. 11894–11905.

- [Kum91] S. Kumar et al. *Adenine photodimerization in deoxyadenylate sequences: elucidation of the mechanism through structural studies of a major d(ApA) photoproduct*. Nucleic Acids Res. 19(11) (Juni 1991), S. 2841–2847.
- [Lam60] J.-H. Lambert. *Photometria : Sciences de la matière et appliquées* (1760). <http://docnum.u-strasbg.fr>.
- [Lee04] J.-H. Lee et al. *NMR structure of the DNA decamer duplex containing double T·G mismatches of cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer: implications for DNA damage recognition by the XPC-hHR23B complex*. Nucleic Acids Res. 32(8) (Apr. 2004), S. 2474–2481.
- [Lib94] F. O. Libnau, O. M. Kvalheim, A. A. Christy und J. Toft. *Spectra of water in the near- and mid-infrared region*. Vib. Spectrosc. 7(3) (Sep. 1994), S. 243–254.
- [Lin93] T. Lindahl. *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature 362(6422) (Apr. 1993), S. 709–715.
- [Liu16a] L. Liu. *Cyclobutane Pyrimidine Dimers via Photosensitization – Combined Stationary and Time-resolved Studies*. Text.PhDThesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, Juli 2016.
- [Liu16b] L. Liu, B. M. Pilles, J. Gontcharov, D. B. Bucher und W. Zinth. *Quantum Yield of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation Via the Triplet Channel Determined by Photosensitization*. J. Phys. Chem. B 120(2) (Jan. 2016), S. 292–298.
- [LL10] G. Lin und L. Li. *Elucidation of Spore-Photoproduct Formation by Isotope Labeling*. Angew. Chem. Int. Ed. 49(51) (Dez. 2010), S. 9926–9929.
- [LR93] D. G. E. Lemaire und B. P. Ruzsicska. *Quantum Yields and Secondary Photoreactions of the Photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU*. Photochemistry and Photobiology 57(5) (Mai 1993), S. 755–757.
- [Lu15] Z. Lu, A. A. Beckstead, B. Kohler und S. Matsika. *Excited State Relaxation of Neutral and Basic 8-Oxoguanine*. J. Phys. Chem. B 119(26) (Juli 2015), S. 8293–8301.
- [Luo01] W. Luo, J. G. Muller, E. M. Rachlin und C. J. Burrows. *Characterization of Hydantoin Products from One-Electron Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine in a Nucleoside Model*. Chem. Res. Toxicol. 14(7) (Mai 2001), S. 927–938.
- [Mad13] G. S. Madugundu et al. *Generation of Guanine–Thymine Cross-Links in Human Cells by One-Electron Oxidation Mechanisms*. Chem. Res. Toxicol. 26(7) (Juli 2013), S. 1031–1033.

- [Mar05] D. Markovitsi, D. Onidas, T. Gustavsson, F. Talbot und E. Lazzarotto. *Collective Behavior of Franck-Condon Excited States and Energy Transfer in DNA Double Helices*. J. Am. Chem. Soc. 127(49) (Nov. 2005), S. 17130–17131.
- [Mar06] D. Markovitsi et al. *Molecular spectroscopy: Complexity of excited-state dynamics in DNA*. Nature 441(7094) (Juni 2006), E7.
- [MBK07] C. T. Middleton, C. Boiko und B. Kohler. *Solvent and Solvent Isotope Effects on the Vibrational Cooling Dynamics of a DNA Base Derivative*. J. Phys. Chem. A 111(42) (Okt. 2007), S. 10460–10467.
- [MCH93] S. L. Murov, I. Carmichael und G. L. Hug. *Handbook of Photochemistry, Second Edition*. Taylor & Francis, 1993.
- [MF84] S. L. Mattes und S. Farid. *Exciplexes and Electron Transfer Reactions*. Science 226(4677) (Nov. 1984), S. 917–921.
- [Mid09] C. T. Middleton et al. *DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix*. Annual Review of Physical Chemistry 60(1) (2009), S. 217–239.
- [MM05] S. Marguet und D. Markovitsi. *Time-Resolved Study of Thymine Dimer Formation*. J. Am. Chem. Soc. 127(16) (Apr. 2005), S. 5780–5781.
- [Mor90] H. Morrison. *Bioorganic Photochemistry, Vol.1: Photochemistry and the Nucleic Acids*. John Wiley et Sons, 1990.
- [Mul94] K. B. Mullis. *The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie International Edition in English 33(12) (Juni 1994), S. 1209–1213.
- [Mün11] M. Münzel, C. Szeibert, A. F. Glas, D. Globisch und T. Carell. *Discovery and Synthesis of New UV-Induced Intrastrand C(4-8)G and G(8-4)C Photolesions*. J. Am. Chem. Soc. 133(14) (März 2011), S. 5186–5189.
- [Mur93] C. Murphy et al. *Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix*. Science 262(5136) (Nov. 1993), S. 1025–1029.
- [Pan12] Z. Pan, J. Chen, W. J. Schreier, B. Kohler und F. D. Lewis. *Thymine Dimer Photoreversal in Purine-Containing Trinucleotides*. J. Phys. Chem. B 116(1) (Jan. 2012), S. 698–704.
- [Pap02] G. Papadantonakis et al. *Low-Energy, Low-Yield Photoionization, and Production of 8-Oxo-2'-deoxyguanosine and Guanine from 2'-Deoxyguanosine*. J. Phys. Chem. B 106 (Juli 2002).
- [Par10] A. W. Parker, C. Y. Lin, M. W. George, M. Towrie und M. K. Kuimova. *Infrared Characterization of the Guanine Radical Cation: Finger Printing DNA Damage*. J. Phys. Chem. B 114(10) (März 2010), S. 3660–3667.

- [PH11] Y. Paukku und G. Hill. *Theoretical Determination of One-Electron Redox Potentials for DNA Bases, Base Pairs, and Stacks*. J. Phys. Chem. A 115(18) (Mai 2011), S. 4804–4810.
- [Pil14a] B. M. Pilles et al. *Identification of charge separated states in thymine single strands*. Chem. Commun. 50(98) (Nov. 2014), S. 15623–15626.
- [Pil14b] B. M. Pilles et al. *Mechanism of the Decay of Thymine Triplets in DNA Single Strands*. J. Phys. Chem. Lett. 5(9) (Mai 2014), S. 1616–1622.
- [Pil16] B. M. Pilles. *Monitoring the excited state dynamics of thymine by time-resolved IR spectroscopy*. PhD Thesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, Juli 2016.
- [Pör73] D. Pörschke. *A Specific Photoreaction in Polydeoxyadenylic Acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70(9) (Sep. 1973), S. 2683–2686.
- [RDC01] J.-L. Ravanat, T. Douki und J. Cadet. *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. J. Photochem. Photobiol., B 63(1) (Okt. 2001), S. 88–102.
- [Rok14] Y. Rokhlenko, J. Cadet, N. E. Geacintov und V. Shafirovich. *Mechanistic Aspects of Hydration of Guanine Radical Cations in DNA*. J. Am. Chem. Soc. 136(16) (Apr. 2014), S. 5956–5962.
- [Rot05] L. S. Rothman et al. *The HITRAN 2004 molecular spectroscopic database*. J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer 96(2) (Dez. 2005), S. 139–204.
- [Rug15] S. Rugheimer, A. Segura, L. Kaltenegger und D. Sasselov. *UV Surface Environment of Earth-like Planets Orbiting FGKM Stars through Geological Evolution*. Astrophys. J. 806(1) (Juni 2015), S. 137.
- [RWS17] S. Ranjan, R. Wordsworth und D. D. Sasselov. *The Surface UV Environment on Planets Orbiting M Dwarfs: Implications for Prebiotic Chemistry and the Need for Experimental Follow-up*. ApJ 843(2) (2017), S. 110.
- [San16] A. Sancar. *Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture)*. Angew. Chem. Int. Ed. 55(30) (Juli 2016), S. 8502–8527.
- [SB17] A. Sedova und N. K. Banavali. *Geometric Patterns for Neighboring Bases Near the Stacked State in Nucleic Acid Strands*. Biochemistry 56(10) (März 2017), S. 1426–1443.
- [Sch04] T. Schrader et al. *Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and Raman probing*. Chem. Phys. Lett. 392(4) (Juli 2004), S. 358–364.

- [Sch08] W. J. Schreier. *UV-Strahlung und DNA-Schäden – Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. PhD Thesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, Mai 2008.
- [Sch09] W. J. Schreier et al. *Thymine Dimerization in DNA Model Systems: Cyclobutane Photolesion Is Predominantly Formed via the Singlet Channel*. J. Am. Chem. Soc. 131(14) (März 2009), S. 5038–5039.
- [Sch10] W. J. Schreier, J. Kubon, P. Clivio, W. Zinth und P. Gilch. *DNA photodamage: Study of cyclobutane pyrimidine dimer formation in a locked thymine dinucleotide*. Journal of Spectroscopy 24(3-4) (2010), S. 309–316.
- [Sch14] A. Schlüter. *Excited State Dynamics of Nucleobases in Natural DNA Investigated by Femtosecond Infrared Spectroscopy*. M.Sc. Thesis. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014.
- [Sch17a] S. Schiffers et al. *Quantitative LC-MS Provides No Evidence for m6dA or m4dC in the Genome of Mouse Embryonic Stem Cells and Tissues*. Angew. Chem. Int. Ed. 56(37) (Sep. 2017), S. 11268–11271.
- [Sch17b] A. P. Schuch, Moreno, Natália Cestari, Schuch, Natielen Jacques, Menck, Carlos Frederico Martins und Garcia, Camila Carriao Machado. *Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions*. Free Radical Biology and Medicine 107 (Juni 2017), S. 110–124.
- [SGZ15] W. J. Schreier, P. Gilch und W. Zinth. *Early Events of DNA Photodamage*. Annu. Rev. Phys. Chem. 66(1) (Apr. 2015), S. 497–519.
- [SM09] L. Serrano-Andrés und M. Merchán. *Are the five natural DNA/RNA base monomers a good choice from natural selection?: A photochemical perspective*. J. Photochem. Photobiol., C 10(1) (März 2009), S. 21–32.
- [SMK12] C. Su, C. T. Middleton und B. Kohler. *Base-Stacking Disorder and Excited-State Dynamics in Single-Stranded Adenine Homo-oligonucleotides*. J. Phys. Chem. B 116(34) (Aug. 2012), S. 10266–10274.
- [Ste89] S. Steenken. *Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts*. Chem. Rev. 89(3) (Mai 1989), S. 503–520.
- [Stö07] H. Stöcker. *Taschenbuch der Physik, Fifth Edition*. Verlag Harri Deutsch, 2007.
- [Sza18] R. Szabla, H. Kruse, P. Stadlbauer, J. Sponer und A. L. Sobolewski. *Sequential Electron Transfer Governs the UV-Induced Self-Repair of DNA Photolesions*. Chem. Sci. (Feb. 2018).

- [Tak08] T. Takaya, C. Su, K. d. L. Harpe, C. E. Crespo-Hernández und B. Kohler. *UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases*. PNAS 105(30) (Juli 2008), S. 10285–10290.
- [Tay95] J.-S. Taylor. *DNA, sunlight and skin cancer*. Pure Appl. Chem. 67(1) (1995), S. 183–190.
- [Uml85] M. E. Umlas, W. A. Franklin, G. L. Chan und W. A. Haseltine. *Ultraviolet Light Irradiation of Defined-Sequence Dna Under Conditions of Chemical Photosensitization*. Photochemistry and Photobiology 42(3) (Sep. 1985), S. 265–273.
- [Wag05] H.-A. Wagenknecht. *Principles and Mechanisms of Photoinduced Charge Injection, Transport, and Trapping in DNA. Charge Transfer in DNA*. Hrsg. von P. H.-A. Wagenknecht. DOI: 10.1002/3527606629.ch1. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, S. 1–26.
- [WC53] J. D. Watson und F. H. C. Crick. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature 171(4356) (Apr. 1953), S. 737–738.
- [WH00] K. L. Willett und R. A. Hites. *Chemical Actinometry: Using o-Nitrobenzaldehyde to Measure Lamp Intensity in Photochemical Experiments*. J. Chem. Educ. 77(7) (Juli 2000), S. 900.
- [WR96] P. D. Wood und R. W. Redmond. *Triplet State Interactions between Nucleic Acid Bases in Solution at Room Temperature: Intermolecular Energy and Electron Transfer*. J. Am. Chem. Soc. 118(18) (Mai 1996), S. 4256–4263.
- [YSG17] T. Yagura, A. P. Schuch und C. C. M. Garcia. *Direct participation of DNA in the formation of singlet oxygen and base damage under UVA irradiation*. Free Radical Biology and Medicine 108 (Juli 2017), S. 86–93.
- [Zha13] Y. Zhang et al. *Ultrafast Excited-State Dynamics and Vibrational Cooling of 8-Oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in D2O*. J. Phys. Chem. A 117(48) (Dez. 2013), S. 12851–12857.
- [Zha15] Y. Zhang, K. de La Harpe, A. A. Beckstead, R. Improta und B. Kohler. *UV-Induced Proton Transfer between DNA Strands*. J. Am. Chem. Soc. 137(22) (Juni 2015), S. 7059–7062.
- [Zha96] X. Zhao, S. Nadji, J. L. Kao und J. S. Taylor. *The structure of d(TpA), the major photoproduct of thymidyl-(3'5')-deoxyadenosine*. Nucleic Acids Res. 24(8) (Apr. 1996), S. 1554–1560.

- [ZIK13] Y. Zhang, R. Improta und B. Kohler. *Mode-specific vibrational relaxation of photoexcited guanosine 5'-monophosphate and its acid form: a femtosecond broadband mid-IR transient absorption and theoretical study*. Phys. Chem. Chem. Phys. 16(4) (Dez. 2013), S. 1487–1499.
- [ZZ09] W. Zinth und U. Zinth. *Optik: Lichtstrahlen - Wellen - Photonen*. Oldenbourg, 2009.

Internetbasierte Referenzen

- [18a] *Data and Properties: Optics fused silica*. <https://www.heraeus.com>. Jan. 2018.
- [18b] *Handbuch des Verkehrsunfalls / Teil 2 - Unfallaufklärung und Fahrzeugschaden*. 978-3-214-12904-0. Feb. 2018.
- [18c] *Illumina Sequencing*. <http://www.illumina.com>. Jan. 2018.
- [18d] *NCBI Genome Database*. <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>. Jan. 2018.
- [18e] *Refractive index of Water and Heavy Water*. <https://refractiveindex.info>. Jan. 2018.
- [18f] *Solar Spectral Irradiance: ASTM G-173*. <http://rredc.nrel.gov>. Jan. 2018.
- [18g] *UV spectrum of oligonucleotides - IDT Biophysics*. <http://biophysics.idtdna.com>. Jan. 2018.
- [AK94] C. P. Adams und S. J. Kron. *Method for performing amplification of nucleic acid with two primers bound to a single solid support*. Patent US5641658. Aug. 1994.
- [Osc03] W. Oschmann. *Vier Milliarden Jahre Klimageschichte im Überblick*. Deutscher Wetterdienst - Wetter und Klima - Leistungen. 2003.

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen. Insbesondere möchte ich hervorheben:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für die Betreuung der Arbeit, seine Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen, welche er durch seinen großen Wissens- und Erfahrungsschatz stets bereichert hat.

Prof. Dr. Thomas Carell für die Kooperationen im Rahmen des CPD-Selbstreparatur- und 8-OxoG-Projektes und die inspirierenden Diskussionen.

Prof. Dr. Dieter Braun für die Kooperation im Rahmen des Sequenzierungs-Projektes.

Prof. Dr. Peter Gilch für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Dominik B. Bucher für seine große Unterstützung über den kompletten Verlauf der Arbeit hinweg und darüber hinaus.

Dr. Christof B. Mast für die intensive Zusammenarbeit im Rahmen des Sequenzierungs-Projektes und seine Unterstützung.

Matthias Q. Kurz für sein großes Engagement im Rahmen des CPD-Selbstreparatur-Projektes, die methodische Unterstützung, welche diesen Teil der Arbeit ermöglicht hat und seine fachliche Beratung.

Dr. Jessica Steinbacher, Dr. Olesea Kosmatchev und Kerstin Kurz für zahlreiche QQQ-Messungen und Diskussionen, welche das 8-OxoG Projekt ermöglicht haben.

Dr. Markus Müller für die inspirierenden Diskussion und die weitreichende fachkundige Unterstützung.

Dr. Rafal Szabla für seine Arbeiten zum GAT=T Reaktionsmechanismus und die kompetente Beratung bei theoretischen Fragen.

Alexander Schlüter für die Einführung in die Projekte.

Meinen Bachelor-Studenten und Hilfskräften, Masa Bozic, Stefan Seebauer, Anna-Sophie Duque und Christopher Scharnagl für die vielen Messungen und Simulationen, welche Grundlagen für diese Arbeit gelegt haben.

Dr. Stefan Krebs für zahlreiche Illumina-Sequenzierungen.

Carola Draxler für ihre Unterstützung bei den MALDI-TOF Messungen.

Dr. Wolfgang J. Schreier für seine freundliche Beratung.

Prof. Dr. Erik Schleicher und Dr. Ryan Rodriguez für die Kooperation im Rahmen des DmCry-Projektes.

Den Korrekturlesern, Dr. Dominik B. Bucher, Dr. Markus Müller, Dr. Christof B. Mast, Matthias Q. Kurz, Prof. Dr. Maria B. Kufner und Tomy Kufner für ihre Anmerkungen.

Allen Mitarbeitern des BMO, welche hier nicht namentlich erwähnt sind, für ihre freundliche Unterstützung.

Meiner Familie für ihre Liebe und den Rückhalt.